

**Stammzellfunktion des Gens *bällchen*
am Beispiel der Spermatogenese von *Drosophila melanogaster***

Von dem Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Kathrin Klinge
aus Bad Segeberg

1. Referentin oder Referent: Prof. Dr. Hans-Henning Arnold
 2. Referentin oder Referent: Prof. Dr. Herbert Jäckle
- eingereicht am: 19.10.2005
- mündliche Prüfung (Disputation) am: 06.01.2006

2006 (Druckjahr)

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor oder den Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge:

Klinge, K. Onichtchouk, D. & Jäckle, H.: Bällchen is a novel Ser/Thr Kinase involved in germ cell development. (Poster) 45th Drosophila Research Conference, Washington, DC (2004).

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Molekulare Entwicklungsbiologie am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen unter der Anleitung von Prof. Dr. Herbert Jäckle angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Herbert Jäckle für die Unterstützung des Projektes, seine Diskussionsbereitschaft und sein Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Hans-Henning Arnold an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig danke ich für die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit.

Alf Herzig, Tina Herzig und Ralf Pflanz haben mit wertvollem Rat und wichtigen Anregungen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Tina Herzig, Alf Herzig und den anderen Mitgliedern der Abteilung möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | DIE ENTWICKLUNG VON <i>DROSOPHILA</i> | 2 |
| 1.2 | SPERMATOGENESE IN <i>DROSOPHILA</i> | 4 |
| 1.3 | DIE ENTWICKLUNG DER MÄNNLICHEN GONADEN | 8 |
| 1.4 | GENETISCHE KONTROLLE DER SPERMATOGENESE | 10 |
| 2 | ERGEBNISSE | 19 |
| 2.1 | MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG VON <i>BÄLLCHEN</i> (<i>BALL</i>) | 19 |
| 2.2 | EXPRESSIONSSTUDIE DES <i>BÄLLCHEN</i> -TRANSKRIPTS | 22 |
| 2.3 | IDENTIFIZIERUNG DES <i>BÄLLCHEN</i> -ALLELS <i>BALL</i> ¹ | 24 |
| 2.3.1 | Die Insertionsstelle des transposablen Elements <i>EP0863</i> | 24 |
| 2.3.2 | Die <i>EP0863</i> -Insertion ist verantwortlich für die Sterilität der Männchen | 26 |
| 2.3.3 | Die <i>EP0863</i> -Linie ist ein Allel von <i>bällchen</i> | 27 |
| 2.4 | HERSTELLUNG WEITERER ALLELE VON <i>BÄLLCHEN</i> | 28 |
| 2.4.1 | Ergebnisse des Reversions-Screens | 28 |
| 2.4.2 | Southern-Blot-Analyse der <i>ball</i> -Allele | 30 |
| 2.4.3 | Bestimmung der Bruchpunkte der Defizienz in <i>ball</i> ² | 31 |
| 2.4.4 | Genetische Charakterisierung der <i>ball</i> -Allele | 33 |
| 2.5 | ALLGEMEINE PHÄNOTYPISCHE ANALYSEN VON <i>BÄLLCHEN</i> | 34 |
| 2.5.1 | Letale Phase und Puppenentwicklung | 34 |
| 2.5.2 | Untersuchungen zur embryonalen Funktion von <i>bällchen</i> | 36 |
| 2.5.3 | <i>bällchen</i> -abhängige Defekte während der Larvenentwicklung | 39 |
| 2.6 | PHÄNOTYPISCHE UNTERSUCHUNGEN DER KEIMZELLENTWICKLUNG IN <i>BÄLLCHEN</i> -MUTANTEN ... | 40 |
| 2.6.1 | <i>bällchen</i> -Aktivität ist für die Keimzellentwicklung von Männchen und Weibchen notwendig | 40 |
| 2.6.2 | Die <i>bällchen</i> -Proteinexpression während der Entwicklung der Gonaden | 42 |
| 2.6.3 | Untersuchungen der somatischen Gonadenkomponenten | 44 |
| 2.6.4 | <i>bällchen</i> wird zum Überleben der Keimzellen benötigt | 46 |
| 2.6.5 | <i>bällchen</i> wird in der männlichen Keimbahn für die Proliferation der Keimzellen benötigt | 49 |
| 2.6.6 | Die Keimzellen differenzieren in <i>ball</i> ¹ | 52 |
| 2.6.7 | <i>bällchen</i> wird in der männlichen Keimbahn für den Erhalt der Stammzellen benötigt | 54 |
| 2.6.8 | Die Funktion von <i>bällchen</i> in der männlichen Keimbahn ist Keimzell-autonom | 56 |
| 3 | DISKUSSION | 59 |
| 3.1 | DAS <i>VRKI</i> -HOMOLOG <i>BALL</i> IST ESSENTIELL FÜR DIE ENTWICKLUNG VON <i>DROSOPHILA</i> | 59 |
| 3.2 | <i>BALL</i> WIRD IN EMBRYONALEN STAMMZELLPOPULATIONEN EXPRIMIERT UND FÜR DIE ENTWICKLUNG PROLIFERIERENDER GEWEBE BENÖTIGT | 61 |
| 3.3 | <i>BALL</i> -AKTIVITÄT WIRD FÜR ERHALT/PROLIFERATION DER KEIMBAHNSTAMMZELLEN IN MÄNNCHEN BENÖTIGT | 63 |
| 3.4 | DIE ZELLAUTONOME <i>BALL</i> -AKTIVITÄT REICHT FÜR DEN ERHALT DER KEIMBAHNSTAMMZELLEN AUS | 65 |
| 3.5 | <i>BALL</i> -AKTIVITÄT WIRD <i>p53</i> -UNABHÄNGIG ZUM ÜBERLEBEN DER KEIMZELLEN IN MÄNNCHEN BENÖTIGT | 67 |
| 3.6 | MÖGLICHE URSACHEN FÜR DIE PROLIFERATIONSSTÖRUNG IN DEN STAMMZELLEN | 68 |
| 3.7 | MÖGLICHE BETEILIGUNG VON <i>BALL</i> AN PROLIFERATIONSPROZESSEN DER STAMMZELLEN IN DER MÄNNLICHEN KEIMBAHN | 69 |
| 3.8 | MÖGLICHE ROLLE VON <i>BALL</i> ALS ALLGEMEINER STAMMZELLFAKTOR | 72 |
| 4 | MATERIAL UND METHODEN | 75 |
| 4.1 | STAMMHALTUNG UND ANZUCHT VON BAKTERIEN | 75 |
| 4.2 | MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN | 76 |
| 4.2.1 | Herstellung chemisch kompetenter Zellen | 76 |
| 4.2.2 | Präparation und Reinigung von DNA | 76 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.2.3 | DNA-Analyse und -Bearbeitung..... | 77 |
| 4.2.4 | Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> | 82 |
| 4.2.5 | Klonierung der UAS-Konstrukte..... | 83 |
| 4.2.6 | Klonierung des Expressionskonstrukts..... | 83 |
| 4.2.7 | Herstellung von Digoxigenin (DIG) - und Fluoreszin (FLUO) -markierten RNA-Sonden... | 84 |
| 4.2.8 | Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden..... | 85 |
| 4.2.9 | Vektoren..... | 85 |
| 4.2.10 | Liste der Plasmide..... | 86 |
| 4.2.11 | Liste der Primer..... | 86 |
| 4.2.12 | Western Blot Analyse..... | 87 |
| 4.2.13 | Southern Blot Analyse..... | 88 |
| 4.2.14 | Expression und Reinigung rekombinanter Proteine..... | 89 |
| 4.2.15 | Herstellung von anti-Ball-Antikörpern..... | 90 |
| 4.3 | HISTOLOGIE..... | 90 |
| 4.3.1 | Fixierung von Geweben zur in situ-Hybridisierung..... | 91 |
| 4.3.2 | Fixierung von Geweben zur Antikörperfärbung..... | 91 |
| 4.3.3 | in situ-Hybridisierung..... | 91 |
| 4.3.4 | Antikörperinkubation und Detektion..... | 93 |
| 4.3.5 | Liste der verwendeten Antikörper..... | 95 |
| 4.4 | EMBRYOLOGIE UND GENETIK..... | 96 |
| 4.4.1 | Stammhaltung und Anzucht von <i>Drosophila melanogaster</i> | 96 |
| 4.4.2 | Embryokollektionen..... | 97 |
| 4.4.3 | Larvenkollektionen..... | 97 |
| 4.4.4 | Liste der verwendeten Fliegenlinien..... | 98 |
| 4.4.5 | "Reinigung" und Balanzierung der EP0863-Insertionslinie..... | 100 |
| 4.4.6 | Rekombination zusätzlicher Marker auf das III. Chromosom..... | 100 |
| 4.4.7 | Reversion des EP-Elements..... | 101 |
| 4.4.8 | Einkreuzung von Reportergenen..... | 101 |
| 4.4.9 | Herstellung maternaler Klone von bällchen..... | 102 |
| 4.4.10 | Herstellung transgener Fliegen..... | 103 |
| 4.4.11 | GAL4/UAS-Experimente..... | 104 |
| 4.4.12 | Herstellung von ball/p53- Doppelmutanten..... | 105 |
| 4.5 | ALLGEMEINE PUFFER UND REAGENZIEN..... | 106 |
| 4.5.1 | Herstellung des Einbettmediums Mowiol..... | 107 |
| 4.6 | STATISTIK..... | 107 |
| 4.7 | ABKÜRZUNGEN..... | 107 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 109 |
| 6 | LITERATUR..... | 110 |

1 Einleitung

Die meisten mehrzelligen Organismen bestehen aus einer Vielzahl differenzierter Zellen. Diese bilden Gewebe von unterschiedlichem Bau, Aussehen und Funktion, die in bestimmter Weise angeordnet sind. Die zentrale Frage der Entwicklungsbiologie ist, wie Zellen, die durch Teilung aus einer einzelnen befruchteten Eizelle hervorgehen und das gleiche genetische Potential besitzen, zu einer unterschiedlichen Entwicklung gelangen, so dass am Ende ein organisierter Organismus mit komplexem Muster entsteht. Dabei kommt der Untersuchung der genetischen Regulierung von Entwicklungsprozessen eine besondere Bedeutung zu: Die unterschiedliche Differenzierung zweier Schwesterzellen ist das Ergebnis einer unterschiedlichen Nutzung des gleichen genetischen Potentials.

In den letzten Jahren wurde der Blick durch die Aussicht auf Möglichkeiten der therapeutischen Nutzung von Stammzellen auf einen weiteren Aspekt der Entwicklung gelenkt: Nicht die unterschiedliche Differenzierung der Zellen, sondern die Fähigkeit zur Aufrechterhaltung der Undifferenziertheit steht dabei im Mittelpunkt des Interesses. Stammzellen sind durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung gekennzeichnet (Übersichtsartikel: Spradling et al., 2001; Lin, 2002; Wagers und Weissman, 2004). Entsprechend gilt das wissenschaftliche Interesse der Beantwortung der Fragen, wie die Zellen ihre undifferenzierte Identität über viele Teilungen hinweg bewahren und wie dann die Differenzierung in den Tochterzellen initiiert wird.

In vielen Stammzellsystemen wird das Verhalten der Stammzellen stark von dem umgebenden Mikromillieu, auch Stammzellnische genannt, kontrolliert (Übersichtsartikel: Watt und Hogan, 2000; Spradling et al., 2001; Lin, 2002). Die Stammzellnischen werden von somatischen Zellen gebildet, die über verschiedene Signale auf die in ihr lokalisierten Stammzellen wirken. Zu den am besten untersuchten Stammzellnischen zählen die des Knochenmarks, in dem somatische Osteoblasten die Nische für die hämatopoietischen Stammzellen bilden, und die Stammzellnische des Testis (Calvi et al., 2003). Im Säugertestis sind die basale Membran des Tululus Seminiferous und die Sertolizellen an der Nischenbildung für die

Keimbahnstammzellen beteiligt (Brinster und Zimmermann, 1994; de Rooij und Grootegoed, 1998).

Über die Signale und Regulationsmechanismen innerhalb der Nische in den unterschiedlichen Stammzellsystemen ist bislang wenig bekannt. Die strukturellen und funktionellen Gemeinsamkeiten im Erhalt der Stammzellen lassen, auch auf molekularer Ebene, Ähnlichkeiten zwischen Invertebraten und Vertebraten bzw. zwischen verschiedenen Stammzelltypen vermuten.

Auf Grund der leichten experimentellen Zugänglichkeit gewinnt seit einiger Zeit die Spermatogenese in *Drosophila melanogaster* als *in vivo*-Modell für die Entwicklung von Stammzellen und ihrer frühen Differenzierung zunehmend an Bedeutung (Kiger et al., 2000; Tran et al., 2000; Tulina und Matunis, 2001; Kiger et al., 2001; Kawase et al., 2003; Shivdasani und Ingham, 2003). Dieses Modellsystem zeichnet sich durch eine übersichtliche Anzahl von Stammzellen aus, deren Lage, Morphologie und Markerexpression gut identifiziert werden können. Darüber hinaus gilt *Drosophila melanogaster* (MEIGEN), im Folgenden kurz *Drosophila* genannt, als eines der besterforschten Entwicklungssysteme (Übersichtsartikel: Seyffert et al., 1998). Ihre kurze Generationszeit, verbunden mit einer hohen Nachkommenschaft und einfacher Haltung, bilden ideale Voraussetzungen für die Nutzung als Modellorganismus (Übersichtsartikel: Gilbert, 1997). Mit weniger als 20.000 Genen, verteilt auf nur 5 Chromosomen, besitzt sie ein übersichtliches Genom, das inzwischen sequenziert und annotiert ist (Adams et al., 2000).

1.1 Die Entwicklung von *Drosophila*

Der Lebenszyklus von *Drosophila* umfasst vier Stadien: ein embryonales und drei larvale Stadien, das Puppenstadium und letztlich die Imago (Übersichtsartikel: Gilbert, 1997). Die Generationsdauer beträgt bei 25°C etwa neun Tage. Die Embryonalentwicklung dauert nur ca. 22 Stunden. Die folgenden Larvenstadien sind jeweils 24 Stunden lang und durch Häutungen voneinander getrennt. Nach dem dritten Larvenstadium kommt es zu einer vier Tage dauernden Verpuppung, in deren Verlauf larvales Gewebe hydrolysiert und adultes Gewebe aus den Imaginalscheiben neu gebildet wird (Übersichtsartikel: Gilbert, 1997).

Die Embryonalentwicklung verläuft außerhalb der Fliege. Auf der Grundlage morphologischer Kriterien wurde die Embryonalentwicklung in 17 Stadien unterteilt (Campos-Ortega und Hartenstein, 1985; siehe Abbildung 1.1). Nach der Befruchtung durchläuft der Zellkern der Zygote eine Reihe mitotischer Teilungen; eine morphologische Abgrenzung der Kernbereiche durch Membranen (Zellbildung) erfolgt nicht (Übersichtsartikel: Gilbert, 1997). Nach neun plasmoidalen Kernteilungen wandern die meisten Kerne dieses Syncytiums an die Peripherie, lagern sich dort unterhalb der Membran an und bilden das "syncytiale Blastoderm". Kurz darauf werden von der Oberfläche der Zygote her zwischen den Kernen Membranen eingezogen. Nach insgesamt 13 Mitosen wird so das Blastoderm mit der Bildung eines einschichtigen Epithels zellulär (Übersichtsartikel: Gilbert, 1997). Als erste Zellen bilden sich die Urkeimzellen am posterioren Pol der Zygote. Aus diesen "Polzellen" gehen später, wie unter 1.3 beschrieben, die Keimzellen hervor (Huettner, 1923; Sonnenblick, 1941).

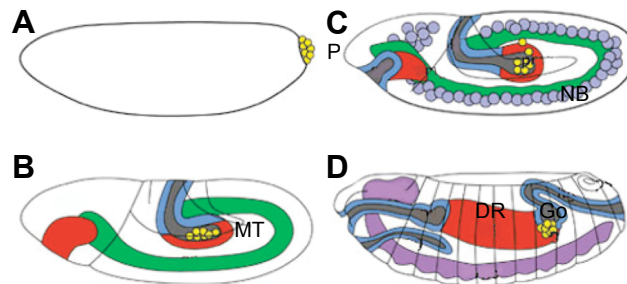


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Embryonalentwicklung von *Drosophila* (modifiziert nach Campos-Ortega und Hartenstein, 1997; anterior befindet sich links, dorsal oben). Vorder- und Hinterdarmgewebe sind in blau, Entoderm und Mitteldarm in rot, Mesoderm in grün und das zentrale Nervensystem in violett dargestellt. (A) Stadium 5: Zelluläres Blastoderm mit Polzellen (PZ, gelb). (B) Stadium 8: Die Streckung des Keimstreifs (KS, grün) und Bildung der Mitteldarmtasche (MT). (C) Stadium 10: Neuroblasten (NB, violett) delaminieren aus dem Neuroektoderm. Die Polzellen passieren das Darmepithel. (D) Stadium 14: Bildung eines durchgängigen Darmrohrs (DR) und der Gonaden (GO).

Nach der Blastodermbildung kommt es zur Spezifizierung der Keimblätter und zur Gastrulation. Parallel dazu verläuft die Streckung des Keimstreifens, was zur teilweisen Verlagerung von ventraler Zellmasse nach posterior führt. Im Embryonalstadium 9 beginnen die Stammzellen des zentralen Nervensystems, die Neuroblasten, mit der Delamination aus dem Neuroektoderm. Die Streckung des Keimstreifs und die Gastrulationsbewegung führen dazu, dass die Polzellen passiv auf die dorsale Seite des Embryos und in die dort gebildete Mitteldarmtasche geleitet werden (Williamson und

Lehmann, 1996; siehe Abbildung 1.1). Im Embryonalstadium 10 beginnen die Polzellen dann mit aktiver Bewegung. Sie passieren das posteriore Darmwandepithel und gelangen nach dorsal, wo sie mit dem Mesoderm in Kontakt treten (Sonnenblick, 1941). Von dort aus wandern die Polzellen gemeinsam mit mesodermalen Gonadenvorläuferzellen zu beiden Seiten des Embryos ins fünfte Abdominalsegment (Boyle und DiNardo, 1995). Hier werden die Polzellen gegen Ende der Embryogenese (Embryonalstadium 14) von den somatischen Gonadenzellen umgeben. Die Wanderung der Polzellen aus der dorsal gelegenen Darmtasche in die ventral gelegenen Gonaden wird von der Verkürzung des Keimstreifs begleitet, wodurch die ventrale Zellmasse wieder in ihre ursprüngliche Position gebracht wird. Gleichzeitig umwachsen die Darmprimordien den zentralen Dottersack und fusionieren schließlich miteinander zu einem durchgehenden Darmrohr. Desweiteren kommt es während der Keimstreifverkürzung zur Ausbildung der inneren Organe und der periodischen Unterteilung der Epidermis durch Segmentgrenzen (Übersichtsartikel: Gilbert, 1997).

1.2 Spermatogenese in *Drosophila*

Die Spermatogenese in *Drosophila* ist ein ausgefeiltes Differenzierungsprogramm (Übersichtsartikel: Fuller, 1993). Die zellulären Vorgänge dieses Prozesses sind auf ultrastruktureller Ebene durch Elektronenmikroskopie beschrieben (Lindsley und Tokuyasu, 1980). Die beteiligten Zelltypen und Entwicklungsstadien der Keimzellentwicklung sind bekannt. Einen Überblick über die Stadien der Spermatogenese ist in Abbildung 1.2 gezeigt.

Die Teilung der Stammzellen

Der Testis enthält eine geringe Anzahl Keimbahnstammzellen (16-18 in Larven, 5-9 in adulten Tieren; Hardy et al., 1997). Sie sind um eine Gruppe kompakter somatischer Zellen in der Testisspitze arangiert. Diese spezialisierten Zellen werden als "Hubzellen" bezeichnet und bilden die Stammzellnische für die Keimbahn (Hardy et al., 1997; Übersichtsartikel: Fuller, 1993). Wenn sich eine Keimbahnstammzelle teilt, verbleibt eine Tochterzelle als Stammzelle in der Stammzellnische, während die andere als "Gonialblast" mit der Differenzierung beginnt (Hardy et al., 1997; Übersichtsartikel:

Fuller, 1993). Die Keimbahnstammzellen werden von "Zystvorläuferzellen" flankiert. Diese somatischen Stammzellen sind in Kontakt mit den Hubzellen (Gönczy und Dinardo, 1996; Hardy et al., 1997). Aus ihnen gehen neue Vorläuferzellen und die Zystzellen hervor. Je zwei Zystzellen umgeben jeden Gonialblasten (Hardy et al., 1997). Die Zystzellen teilen sich nicht mehr, differenzieren aber gemeinsam mit der Keimzelle (Gönczy et al., 1992; Hardy et al., 1997). Die Differenzierung der Zystzellen wird durch Signale von den Keimzellen beeinflusst. Die wird in maternalen Effektmutanten, in denen es zu Störungen der primären Keimzellentwicklung im Embryo kommt, deutlich: In den agametischen Testis proliferieren die Zystzellen ungehemmt weiter (Gönczy und Dinardo, 1996).

Die Nachkommenschaft eines Gonialblasten mitsamt den zwei umgebenden Zystzellen wird als "Zyste" bezeichnet. Sie bildet die kleinste funktionale Einheit in der Spermatogenese (Übersichtsartikel: Fuller, 1993).

Spermatogonienproliferation

Der Gonialblast beginnt die Differenzierung mit einer Serie von vier synchronen mitotischen Teilungsrunden (Übersicht: Fuller, 1993). Eine Besonderheit der Keimzellentwicklung ist, dass die Keimzellen bei den mitotischen und späteren meiotischen Teilungen keine vollständige Cytokinese durchmachen (Lindley und Tokayasu, 1980): Die Keimzellen einer Zyste bleiben durch interzelluläre Plasmabrücken miteinander verbunden (Himme et al., 1996). Diese Verbindungen werden von spektrinreichen Strukturen, den Fusomen durchzogen, die aus kleinen punktförmigen Spektrosomen der Stammzellen und Gonialblasten hervorgehen (Lin et al., 1996). Am Ende der vier mitotischen Teilungsrunden enthalten die Zysten 16 Spermatogonien.

Primäres Spermatozytenwachstum und Meiose

Nach Abschluss des mitotischen Teilungsprogramms beginnen die Spermatogonien mit der Meiose (Übersichtsartikel: Fuller, 1993). Sie durchlaufen synchron die pämeiotische S-Phase und werden danach als "primäre Spermatozyten" bezeichnet. Der größte Teil der primären Spermatozytenentwicklung erfolgt während der verlängerten Prophase. Diese dauert mindestens 90 Stunden (Lindsley und Tokayasu, 1980). Die Zellen

beginnen mit einer Phase starken Wachstums und Genexpression (Lindsley und Tokayasu, 1980). Da die Transkriptionsaktivität am Ende der Spermatozytenentwicklung weitestgehend eingestellt wird, werden während dieser Zeit nahezu alle Gene transkribiert, die für die nachfolgende Spermatogenese benötigt werden (Olivieri und Olivieri, 1965). Am Ende des primären Spermatozytenwachstums besitzen die reifen Spermatozyten aufgrund der hohen Transkriptionsaktivität große, zentral gelegene Kerne mit ausgeprägten Nukleoli (Übersichtsartikel: Fuller, 1993). Die 16 primären Spermatozyten durchlaufen dann die zwei meiotischen Teilungen, so dass die resultierende Zyste letztlich 64 haploide Spermatiden enthält (Übersichtsartikel: Fuller, 1993).

Spermatiddifferenzierung

Während der Differenzierungsphase kommt es zu umfassenden morphologischen Veränderungen in den Spermatiden, welche die Bildung des Flagellums, DNA-Kondensation und Formveränderung des Nukleus bewirken (Übersichtsartikel: Fuller, 1993).

Die Mitochondrien eines haploiden Spermatids schließen sich zu zwei Riesenmitochondrien zusammen, die gemeinsam den "Nebenkern" bilden und für die Bildung des Flagellums von Bedeutung sind (Tokuyasu, 1975). Das Flagellum enthält ein aus Mikrotubuli gebildetes Axonem. Das Axonem entwächst einem Basalkörper an der Basis des Nukleus und ist während der Elongation von den zwei ebenfalls elongierenden Mitochondrienderivaten umgeben (Lindsley und Tokayasu, 1980). Eines dieser Mitochondrienderivate bleibt auch in den Flagellen ausdifferenzierter Spermatiden erhalten, das andere ist nach der Individualisierung der Spermien nicht mehr beobachtbar (Tokuyasu et al., 1972 a; Tokuyasu, 1994).

Während der Elongation kommt es zur starken Kondensation der Spermatid-DNA. Der bislang runde Nukleus nimmt eine nadelartige Form an (Tokuyasu, 1974 b; Lindsley und Tokuyasu, 1980). Die 64 elongierenden Spermatiden einer Zyste bleiben weiterhin von den zwei Zystzellen umgeben. Eine dieser Zystzellen, die "Kopfzystzelle", steht gemeinsam mit den nadelförmigen Nuklei in Verbindung mit dem Terminalepithelium an der Testisbasis (Tokuyasu et al., 1972 a; Lindsley und Tokuyasu, 1980). Die zweite Zystzelle umgibt das wachsende Flagellenbündel.

Am Ende der Spermatogenese steht die Individualisierung der ausdifferenzierten Spermatiden. Die Individualisierung beginnt bei der Kopfzystzelle und setzt sich bis zum Schwanzende fort (Tokuyasu et al., 1972 a). Währenddessen wird die Cytoplasmamasse reduziert. Die Spermatiden verlieren ihre Verbindungen untereinander. Anschließend wickeln sich die individualisierten Spermatiden auf (Tokuyasu et al., 1972 b). Dabei kollabiert die "Schwanzzystzelle". Die aufgerollten Spermatiden werden in das Testislumen entlassen und in die *Vesicula seminalis* geleitet.

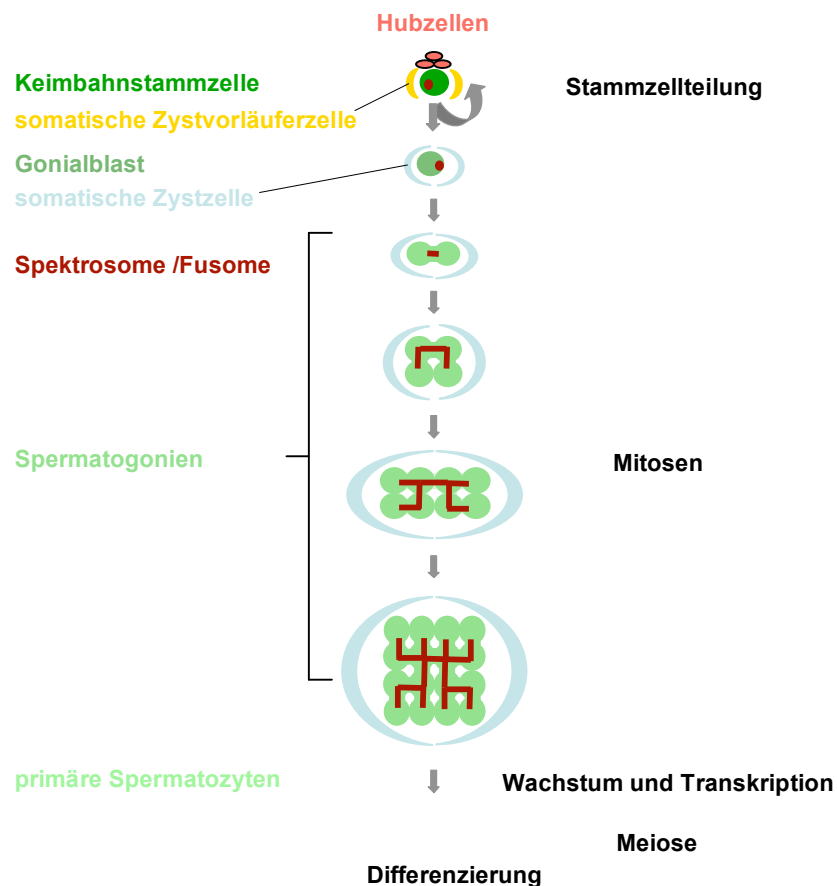


Abb. 1.2: Schema der frühen Keimzellentwicklung im *Drosophila* Testis.

Die Keimbahnstammzellen und die somatischen Zystvorläuferzellen sind in Nachbarschaft zu Hubzellen in der Testisspitze lokalisiert. Aus asymmetrischen Teilungen der Keimbahnstammzellen gehen Gonialblasten hervor. Keimbahnstammzellen und Gonialblasten enthalten punktartige Spektrosomen. In den mitotischen Spermatogonien verzweigen diese Strukturen und durchziehen die Cytoplasmabrücken als Fusome. Die Keimzellzyste bleibt während der gesamten Entwicklung von zwei Zystzellen umschlossen. Nach vier Teilungsrunden mit unvollständiger Cytokinese treten die 16 Keimzellen einer Zyste als primäre Spermatozyten in eine Phase Wachstums- und Transkriptionsphase ein, gefolgt von den meiotischen Teilungen und weiteren Differenzierungen.

1.3 Die Entwicklung der männlichen Gonaden

Wie schon unter 1.1 beschrieben, sind die Polzellen die ersten Zellen, die während der Embryonalentwicklung entstehen (Huettner, 1923; Sonnenblick, 1941). Im Stadium 3 der Embryonalentwicklung werden ca. 43 Polzellen aus dem Keimplasma am posterioren Pol gebildet (Mahowald, 1962; Poirié et al., 1995). Neben der früheren Zellularisierung und der Integration von Keimplasma gibt es noch eine weitere Besonderheit, welche die Zellen der Keimbahn vom Soma unterscheidet. In den somatischen Kernen wird die Transkription bereits im Embryonalstadium 3 initiiert, während die Transkription in den Polzellen erst viel später im Embryonalstadium 10 beginnt (Zalokar, 1976).

Gegen Ende der Embryogenese bilden die Polzellen zusammen mit somatischen Gonadenzellen die paarigen Gonaden (siehe auch 1.1). In den Gonaden sind im Durchschnitt zwischen acht und 14 Polzellen enthalten (Technau und Campos-Ortega, 1986; Hay et al., 1988). Dabei kommt es zu leichten geschlechtsspezifischen Unterschieden bezüglich der Anzahl der integrierten Keimzellen: männliche Gonaden enthalten im Durchschnitt 14 Polzellen, weibliche Gonaden integrieren durchschnittlich 12 Polzellen. Die übrigen Polzellen degenerieren (Poirié et al., 1995).

In den spätembryonalen Gonaden (Embryonalstadium 16) sind für beide Geschlechter ein bis zwei mitotische Teilungszyklen der Polzellen bis zum Schlüpfen der ersten Larvenstadien möglich (Übersichtsartikel: Fuller, 1993). In den folgenden Larvenstadien kommt es zu weiteren Unterschieden in der Entwicklung der weiblichen und männlichen Gonaden. Die weiblichen Polzellen durchlaufen bis zur Verpuppung lediglich mitotische Teilungen, so dass die Gonaden am Ende der Larvenentwicklung je ca. 90 primäre Keimzellen enthalten (Kai und Spradling, 2004). Die Differenzierung der weiblichen Keimbahn beginnt während der Puppenentwicklung (King, 1970). Männliche Gonaden dagegen enthalten bereits beim Schlüpfen der ersten Larvenstadien Spermatogonien (Sonnenblick, 1941). Die Keimzellen entwickeln sich in der männlichen Larve bis zur G2-Phase der primären Spermatozytenreifung. In diesem Stadium arretiert dann die Entwicklung bis zum Beginn der Verpuppung. Während dieser Zeit enthalten die ovoid geformten männlichen Gonaden bereits Zysten mit reifenden primären Spermatozyten. Die Keimbahnstammzellen und Zystvorläuferzellen

sind um somatische Hubzellen im apikalen Testisbereich lokalisiert, von wo aus die wachsenden Spermatozyten in Richtung Testisbasis verdrängt werden. Dort befinden sich somatische "Terminalepithelzellen", die eine Rolle bei der Metamorphose des Testis spielen.

Während der Metamorphose verändert sich die Form des Testis von ovoid zu einem spiralförmig aufgewundenen Testisschlauch. Diese morphologischen Veränderungen werden über Signale der *Vesicula seminalis* vermittelt, die aus den Genitalimaginalscheiben hervorgehen (Übersichtsartikel: Fuller, 1993). Wenn die *Vesicula seminalis* die Testisbasis am Samenleiter erreichen, beginnen die somatischen Terminalzellen mit morphologischen Veränderungen, welche die Ausbildung des Testisschlauchs zur Folge haben (Übersichtsartikel: Fuller, 1993).

Die adulte männliche Gonade besteht aus zwei Testisschläuchen, die über Samenleiter in die *Vesicula seminalis* führen (Übersichtsartikel: Fuller, 1993; siehe Abbildung 1.3). Diese Speicher der ausdifferenzierten Spermatiden münden zusammen mit ebenfalls paarig angelegten somatischen Anhangsdrüsen in den *Ductus ejaculatorius* (Übersichtsartikel: Fuller, 1993).

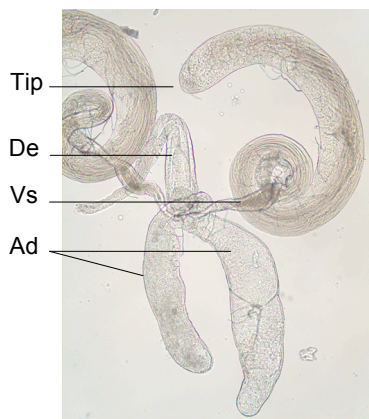


Abb. 1.3 : Lichtmikroskopische Aufnahme einer adulten männlichen Gonade.

Die Keimzellproliferation beginnt in der Spitze des Testisschlauchs (Tip). Zwei Testisschläuche (nur einer ist abgebildet) münden über die *Vesicula seminalis* (Vs) gemeinsam mit den paarigen somatischen Anhangsdrüsen (Ad) in den *Ductus ejaculatorius* (De).

Die Spermienbildung beginnt an der apikalen Spitze des Testisschlauchs. Dort werden die Keimzellen von Stammzellen gebildet (Lindsley und Tokayasu, 1980; Übersichtsartikel: Fuller, 1993). Durch die kontinuierliche Produktion werden die Keimzellzysten von der Spitze verdrängt und wandern während ihrer Entwicklung an der Testiswand in den basalen Testisbereich (Lindsley und Tokayasu, 1980; Übersichtsartikel: Fuller, 1993). Die Köpfe der differenzierenden Spermatiden befinden

sich an der Testisbasis, ihre Flagellen durchziehen das gesamte Testislumen. Die elongierten Spermatiden gelangen über den Samenleiter in den *Vesicula seminalis* und werden dort bis zur Ejakulation verwahrt (Lindsley und Tokayasu, 1980; Übersichtsartikel: Fuller, 1993).

Durch die kontinuierliche Produktion und Reifung von Keimzellen sind alle Stadien der Spermatogenese zeitgleich im Testisschlauch vorhanden. Die Stammzellen an der Testisspitze teilen etwa alle 10 Stunden. Der entstandene Gonialblast entwickelt sich in ca. 250 Stunden zum reifen Spermatid. Im adulten Testis sind damit zu einem beliebigen Zeitpunkt damit ca. 25 entwickelnde Zysten vorhanden, die aus derselben Stammzelle hervorgehen (Lindsley und Tokayasu, 1980).

1.4 Genetische Kontrolle der Spermatogenese

Das Differenzierungsprogramm der Spermatogenese scheint durch unabhängig voneinander agierende Signalwege reguliert und kontrolliert zu werden. Mutationen, welche die Spermatogenese betreffen, verursachen häufig einen so genannten allgemeinen Sterilitätsphänotyp, bei dem primäre Defekte in der Spermatogenese nicht zur Blockade der weiteren Differenzierung führen (Castrillon et al., 1993; Übersichtsartikel: Fuller, 1993). So kommt es z.B. in mutanten Allelen von *twine*, einem *cdc25*-Homolog, zu Störungen der Chromosomensegregation und Cytokinese während der Meiose der Spermatozyten (Alphey et al., 1992; Courtot et al., 1992). Der Fortlauf der Differenzierung hingegen ist nicht blockiert: Homozygote *twine*-Männchen produzieren Zysten mit 16 anormalen, tetraploiden Spermatiden, die zu elongierten, aber funktionslosen Spermien differenzieren (Courtot et al., 1992).

Neben diesem klassischen Sterilitätsphänotyp, bei dem die Analyse durch Sekundäreffekte erschwert wird, sind aber auch einige andere Phänotypen aussagekräftig. Dies ist bei Mutationen der Fall, welche die Regulation der frühen Spermatogenese in der Stammzellnische betreffen (Castrillon et al., 1993). Die frühe Spermatogenese ist durch wichtige strategische Entscheidungen gekennzeichnet, deren Störung den Verlust der Stammzellen und den Abbruch der Differenzierung zur Folge haben kann (Castrillon et al., 1993; Übersichtsartikel: Fuller, 1993). Dazu gehört der Erhalt der Stammzellen in der Nische (Kiger et al., 2001; Tulina und Matunis, 2001;

Shivdasani und Ingham, 2003; Kawase et al., 2004; Schulz et al., 2004), ein Prozess, der unter anderem durch die asymmetrische Teilung der Stammzellen gewährleistet wird (Yamashita et al., 2003). Als nächstes ist die Einleitung der Gonialblastendifferenzierung für die kontinuierliche Fortführung der Keimzellproduktion und Differenzierung wichtig, später muss dann in den Spermatogonien am Ende der mitotischen Teilungsrunden der Übergang in die meiotische Differenzierung koordiniert werden (Castrillon et al., 1993; Übersichtsartikel: Fuller, 1993).

Regulation von Teilung und Erhalt der Keimbahnstammzellen

Für den Erhalt der Stammzellen und deren Differenzierung sind extrinsische Signale aus der Nische einerseits und die Polarisierung der Stammzelle für die asymmetrische Teilung andererseits notwendig. Die nachfolgend beschriebenen Mechanismen zur Regulation der Spermatogenese sind in Abbildung 1.4 schematisch wiedergegeben.

Die Stammzellnische wird von somatischen Hubzellen an der Testisspitze ("Hub") gebildet. Die abgegebenen Signale wirken in den Stammzellen auf intrinsische Stammzellfaktoren (Giboa und Lehmann, 2004; Yamashita et al., 2005). In der Nische befindet sich außerdem noch eine weitere Stammzellpopulation, die somatischen Zystvorläuferzellen, deren Teilungen mit den asymmetrischen Teilungen der Keimbahnstammzellen koordiniert werden (siehe 1.2).

Für den Erhalt der Keimbahnstammzellen in der Stammzellnische des *Drosophila*-Testis konnte bislang die Funktion einiger Signaltransduktionswege nachgewiesen werden. Der JAK-STAT-Signalweg scheint der wichtigste Signalweg in der männlichen Keimbahn von *Drosophila* zu sein. Seine Bedeutung für den Erhalt der männlichen Keimbahnstammzellen konnte für verschiedene Komponenten der JAK-STAT-Signaltransduktion nachgewiesen werden. Mutante Allele von *hopscotch* (*hop*), dem *Drosophila*-Homolog der Janus-Kinase, und von *stat92E*, dem *Drosophila*-Homolog des Transkriptionsfaktors STAT, zeigen nach Induzierung den schrittweisen Verlust von frühen Spermatogenesestadien durch Ausdifferenzierung (Kiger et al., 2001; Tulina und Matunis, 2001). Als Ligand fungiert Unpaired (Upd). Das Gen *upd* wird normalerweise von den somatischen Hubzellen exprimiert (Kiger et al., 2001; Tulina und Matunis, 2001). Seine zusätzliche ektopische Expression in der Keimbahn führt zu

einer Zunahme der Stammzellen in der Testisspitze (Kiger et al., 2001; Tulina und Matunis, 2001). Die JAK-STAT-Signaltransduktion scheint damit in den Keimbahnstammzellen aktiv zu sein. Die Zielgene des JAK-STAT-Signalwegs in den Stammzellen sind bislang nicht bekannt.

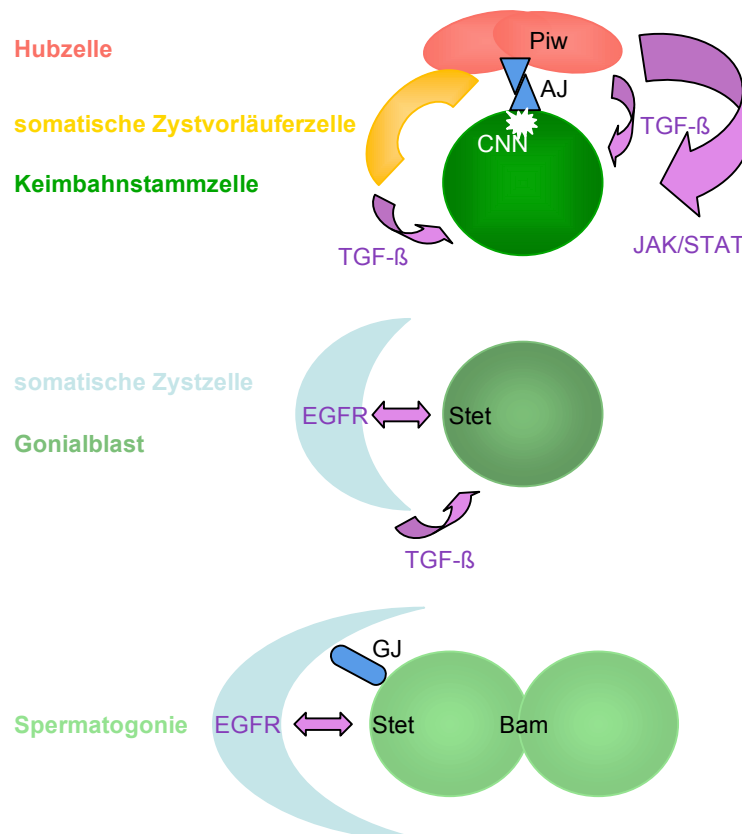


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der genetischen Regulation der frühen Spermatogenese in *Drosophila*.

Zellkontakte sind blau, Signalwege violett dargestellt. Adherens junctions (AJ) zwischen somatischen Hubzellen und Keimbahnstammzellen halten die Stammzellen in der Nische. Das zur Orientierung der Spindel benötigte Centrosomin (Cnn) ist ebenfalls im Bereich der AJ in den Keimbahnstammzellen lokalisiert. Die Hubzellen sekretieren den Liganden Unpaired und aktivieren so den JAK/STAT-Signalweg in den Keimbahnstammzellen. Ein weiterer Faktor für den Erhalt der Keimbahnstammzellen ist der TGF- β -Signalweg. Die Liganden werden von den Zystvorläuferzellen und den Hubzellen sekretiert. Der TGF- β -Signalweg reprimiert die Expression des Differenzierungsfaktors Bam in den Keimbahnstammzellen und Gonialblasten. Für die Bildung bzw. Differenzierung der Gonialblasten wird ferner die Expression von *piwi* in den Hubzellen benötigt. An der Differenzierung der Spermatogonien in der Zyste ist der EGFR-Signalweg beteiligt. Dieser Weg ist in den Zystzellen aktiv. Die Aktivierung erfolgt über die Expression von *stet* in Gonialblasten und Spermatogonien. Für die Entwicklung der Spermatogonien sind außerdem Gap junctions (GJ) zwischen Spermatogonien und umgebende Zystzellen notwendig.

Ein zweiter Signalweg, der in den Keimbahnstammzellen notwendig für deren Erhalt ist, ist der TGF- β -Signalweg. Die Entfernung von Komponenten dieses Signalweges in der Keimbahn führt zum Verlust der Keimbahnstammzellen (Shivdasani und Ingham,

2003). Auch dieser Signalweg wird durch die umgebenden somatischen Gonadenzellen in der Testisspitze reguliert. Die somatischen Hubzellen und Zystzellen exprimieren die zugehörigen Liganden Decaplentaplegic (Dpp), dem TGF- β -Homolog und Glass bottom boat (Gbb) (Shivdasani und Ingham, 2003; Kawase et al., 2004).

Anders als beim JAK-STAT-Signalweg hat die Überexpression von *dpp* in der Keimbahn keinen Einfluss auf die Zahl der Stammzellen, so dass die Aktivität des TGF- β -Signalwegs nicht ausreichend für den Erhalt der Stammzellen im Testis ist (Shivdasani und Ingham, 2003; Schulz et al., 2004). Neben der Funktion beim Erhalt der Stammzellen ist der TGF- β -Signalweg, wie weiter unten beschrieben, auch an der Differenzierung der Keimzellzysten beteiligt (Matunis et al., 1997; Kawase et al., 2004; Shivdasani und Ingham, 2003; Schulz et al., 2004).

Für die Wirkung der Selbsterneuerungssignale der Nische müssen die Stammzellen in direkter Nachbarschaft lokalisiert sein. Die physikalische Verankerung der Stammzellen in der Nische und ihr Verbund durch Zellkontakte könnte ein weiterer wichtiger Faktor für den Erhalt der Keimbahnstammzellen sein. Als Zellkontakte kommen sogenannte Adherens junctions in Frage. Sie verbinden die Keimbahnstammzellen mit den somatischen Hubzellen (Yamashita et al., 2003). Beide Zellarten exprimieren das *DE-cadherin*-Homolog *shotgun* (*shg*) und das β -catenin-Homolog *armadillo* (*arm*), die an den Kontaktpunkten zwischen den Hubzellen und den Keimbahnstammzellen angereichert sind (Yamashita et al., 2003). Hinweise auf eine Funktion dieser Proteine beim Erhalt der männlichen Stammzellen liefern Beobachtungen in der weiblichen Keimbahn. Dort besteht die gleiche Kolo-kalisation von Shg und Arm zwischen den Keimbahnstammzellen und somatischen Nischzellen (Song et al., 2002). Stammzellen, die kein Shg bzw. Arm enthalten, verlieren den Kontakt zur Nische und differenzieren aus (Song et al., 2002).

Neben der Zelladhäsion scheinen die Adherens junctions auch eine Bedeutung für die Polarisierung der Stammzelle zu besitzen (Yamashita et al., 2003). In den männlichen Keimbahnstammzellen ist die Spindel während des gesamten Zellzyklus senkrecht zum Hub orientiert (Yamashita et al., 2003). Durch diese Spindelorientierung entsteht bei Teilung eine Tochterzelle, die in direktem Kontakt zum Hub steht und Stammzelle bleibt, während die zweite, weiter vom Hub entfernte Zelle mit der Gonialblastendifferenzierung beginnt (Yamashita et al., 2003). Eine Veränderung der

Spindelorientierung führt, je nach Lage, zur vermehrten Bildung von Keimbahnstammzellen oder zum Verlust (Yamashita et al., 2003). Der Spindelpol ist in den Keimbahnstammzellen normalerweise an der Seite lokalisiert, die an Hubzellen grenzt. Die Orientierung der Spindel ist vom centrosomalen Protein Centrosomin (Cnn) und dem Homologen des Adenomatous Polyposis Coli (APC)-Tumorsuppressors abhängig (Yamashita et al., 2003). Die Adherens junctions zwischen Stammzellen und Hubzellen könnten bei der Lokalisierung von Apc2 und des Centrosoms eine Rolle spielen und so auf die Spindelpolarität wirken (Yamashita et al., 2003).

Ein weiterer wichtiger Faktor für den Erhalt der Stammzellen in der Keimbahn von Männchen ist Piwi. In Männchen scheint die somatische Funktion dieses Proteins in Hub- und Zystzellen ausreichend für den Erhalt der Keimbahnstammzellen zu sein (Lin und Spradling, 1997; Cox et al., 2000).

Das nukleäre Protein wird in der Testisspitze in den Hubzellen, den Zystvorläuferzellen und den Zystzellen exprimiert (Cox et al., 2000). In der Keimbahn kann Piwi in den frühen Spermatogenesestadien in Nähe der Testisspitze nachgewiesen werden (Cox et al., 2000). Über die Funktion von Piwi ist wenig bekannt. Es gehört zur Familie der PAZ/Piwi-Domänen, die in Proteinen des RNAi-Interference-Systems enthalten sind (Cox et al., 1998; Cerutti et al., 2000; Pal-Bhadra et al., 2002). RNAi-Interference – und Piwi – scheinen eine Funktion beim heterochromatischen Gene silencing zu haben (Pal-Bhadra et al., 2004). *piwi* könnte damit in der Keimbahn durch die Regulation von Genexpressionen zum Erhalt der Stammzellen beitragen.

Kontrolle der Spermatogoniendifferenzierung

Neben Adherens junctions sind auch andere Zellkontakte, wie z.B. Gap junctions, an der frühen Differenzierung der männlichen Keimzellen beteiligt. Gap junctions scheinen interzelluläre Verbindungen zwischen den Spermatogonien und den umgebenden Zystzellen herzustellen (Tazuke et al., 2002). Das *Drosophila*-Homolog des Gap junction-Proteins Innexin 4, Zero population growth (Zpg), wird in den amplifizierenden Spermatogonien exprimiert und ist an den Kontaktpunkten zwischen Spermatogonie und Zystzelle angereichert (Tazuke et al., 2002). Einen Hinweis auf eine Funktion der Gap junctions bei der Proliferation der Spermatogonien liefern *zpg*-

Mutanten. Deren Testes enthalten lediglich wenige frühe Keimzellen, bei denen es sich vermutlich um Stammzellen und Gonialblasten handelt (Tazuke et al., 2002).

Zwei weitere Differenzierungsfaktoren bilden die Proteine, die von *bag of marbles* (*bam*) und *benign gonial cell neoplasm* (*bgn*) kodiert werden. *bam* und *bgn* werden spezifisch in den Spermatogonien exprimiert, nicht aber in Keimbahnstammzellen, Gonialblasten oder Spermatozyten (Gönczy et al., 1997). Die Gene interagieren genetisch miteinander und die Mutanten zeigen jeweils einen sehr ähnlichen Phänotyp. Bam gilt als wichtiger keimzellautonomer Differenzierungsfaktor der Gonialblasten. In *bam*-mutanten Testes kommt es zu einer Anreicherung früher Keimzellstadien. Die Keimzellen beginnen zwar mit der Differenzierung, weisen aber außerdem einige Stammzellmarker auf (Gönczy et al., 1997). Einen gegenläufigen Effekt zeigt die Überexpression von *bam* in den Keimbahnstammzellen und Gonialblasten. Die ektopische Expression führt zum Verlust der Stammzellen, vermutlich durch Ausdifferenzierung (Kawase et al., 2004).

Eine weitere Funktion von *bam* könnte in der Entwicklung der Spermatogonienzysten bestehen. In *bam*-mutanten Testes sind Spermatogonienzysten mit mehr als 16 Keimzellen enthalten. Die Keimzellen innerhalb einer Zyste sind über Fusome miteinander verbunden und teilen synchron (Gönczy et al., 1997). Großkernige primäre Spermatozyten und Derivate in späteren Entwicklungsstadien fehlen (Gönczy et al., 1997). Damit könnte Bam für die Limitierung der mitotischen Amplifikationen innerhalb der Zyste bzw. zur Initiierung der Meiose benötigt werden (Gönczy et al., 1997). Alternativ könnte es sich bei diesem Phänotyp der Mutanten um einen Sekundäreffekt handeln.

Die *bam*-Mißexpressionsphänotypen zeigen, dass die Expression dieses wichtigen Differenzierungsfaktors streng reguliert werden muss. Es gibt Hinweise darauf, dass die Expression von *bam* durch Signale aus den umgebenden Zystzellen kontrolliert wird (Shivdasani et al., 2003; Kawase et al., 2004; Schulz et al., 2004). Dabei scheint der TGF- β -Signalweg eine reprimierende Funktion in den Stammzellen und Gonialblasten zu haben, denn Mutanten von verschiedenen Komponenten dieses Signalwegs zeigen eine ektopische Expression von *bam* in den Keimbahnstammzellen (Kawase et al., 2004).

In den Zystzellen ist ein weiterer Signalweges zur Regulation der Keimzelldifferenzierung aktiv. Die Aktivierung des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-Signaltransduktionsweges in den Zystzellen wird für die Differenzierung der Gonialblasten und Spermatogonien benötigt. Bei einem temperatursensitiven Allel des EGFR kommt es bei der nicht permissiven Temperatur zur Anhäufung von Keimzellen früher Stadien, die Eigenschaften von Stammzellen und Gonialblasten aufweisen (Kiger et al., 2000). Darüber hinaus sind in mutanten Testes des EGFR-Signalwegs Zysten mit mehr als 16 Keimzellen zu finden, so dass der EGFR-Signalweg außerdem für das Beenden der mitotischen Amplifizierungen der Spermatogonien bzw. den Eintritt in die Meiose bedeutend ist (Kiger et al., 2000; Tran et al., 2000). In den Mutanten ist die Assoziation der Keimzellen mit den Zystzellen unterbrochen, was bedeuten könnte, dass der Kontakt zwischen Zystzelle und Keimzelle für die Transduktion von weiteren Differenzierungssignalen wichtig ist.

Die Aktivierung des EGFR-Signalweges erfolgt vermutlich durch die Keimzellen (Schulz et al., 2002). Dort zeigen mutante Allele des Gens *stet* einen sehr ähnlichen Phänotyp (Schulz et al., 2002). Bei *stet* handelt es sich um ein Homolog von Rhomboid, einem Protein, das für die Spaltung und Aktivierung des EGFR-Liganden Spitz benötigt wird (Lee et al., 2001; Urban et al., 2001). Die Funktion von *stet* ist keimzellautonom (Schulz et al., 2002), die Aktivierung des EGFR-Signalwegs muss hingegen in den Zystzellen erfolgen (Kiger et al., 2000; Tran et al., 2000; Schulz et al., 2002).

Viele der oben beschriebenen Mechanismen zum Erhalt und zur Differenzierung der Keimbahnstammzellen im *Drosophila*-Testis finden auch in anderen Stammzellsystemen Anwendung. Einen generellen Mechanismus zum Erhalt von Stammzellen in der Nische scheinen dabei die Adherens junctions zu bilden. Im larvalen Gehirn von *Drosophila* spielen beispielsweise Adherens junctions in der Neuroblastenstammzellnische eine wichtige Rolle bei der Proliferation der Neuroblasten (Dumstrei et al., 2003). Ferner konnte bei hämatopoietischen Stammzellpopulationen der Maus die asymmetrische Lokalisation der Adherens junctions-Proteine N-catherin und β -catenin an der Membran, die mit der Nische in Kontakt steht, gezeigt werden (Zhang et al., 2003).

In vielen Stammzellsystemen, wie z.B. den neuronalen Stammzellen von *Drosophila*, ist die Ausrichtung der Mitosespindeln wichtig für die Bildung zweier Tochterzellen mit unterschiedlichem Entwicklungspotential (Kaltschmid et al., 2000). Unterschiede scheint es aber in der Art, wie die Polarisierung der Spindel erreicht wird, zu geben. So ist die Spindelorientierung in den Stammzellen der weiblichen Keimbahn von *Drosophila*, anders als in Männchen, von der Position des Spektrosoms abhängig (Deng und Lin, 1997).

Für die Signalübermittlung von den somatischen Nischzellen an die Stammzellen scheinen in den Stammzellsystemen ebenfalls verschiedene Signalwege genutzt zu werden. Der JAK-STAT-Signalweg z.B. hat unterschiedliche Funktionen in der männlichen und weiblichen Keimbahn von *Drosophila*. In der Spermatogenese ist er der wichtigste Signalweg zum Erhalt der Keimbahnstammzellen in der Nische, in der weiblichen Keimbahn dagegen scheint er höchstens eine untergeordnete Rolle zu spielen. In heteroallelischen Kombinationen verschiedener mutanter Komponenten dieses Signalwegs scheint die frühe Proliferation und Differenzierung der Keimzellen nicht gestört zu sein (Silver und Montell, 2001). Defekte treten in den somatischen Folikelzellen bei der Einkapselung der Keimzellzyste und bei späteren Differenzierungen auf (Silver und Montell, 2001; Ghiglione et al., 2002; McGregor et al., 2002). Der JAK-STAT-Signalweg wird in der Oogenese also für die Differenzierung der somatischen Zellen benötigt. Für den Erhalt und die Proliferation der Keimbahnstammzellen in der weiblichen Stammzellnische ist vor allem der TGF- β -Signalweg verantwortlich (Xie und Spradling, 1998). Unklar ist bislang, wie die verschiedenen Signalwege in den Stammzellen zur Bildung der Polarität der Stammzellen führen. Die Polarität drückt sich in einigen Stammzellsystemen auch dadurch aus, dass es in der Stammzelle zur asymmetrischen Lokalisierung von Determinanten kommt. Im zentralen Nervensystem von *Drosophila* z.B. ist der Transkriptionsfaktor Prospero in den Neuroblasten so lokalisiert, dass er bei Teilung nur an eine Tochterzelle weitergegeben werden kann und diese zur Differenzierung bringt (Doe et al., 1991; Matsuzaki et al., 1992; Knoblich et al., 1995; Broadus et al., 1998). Solch intrinsische Faktoren konnten für die männliche Keimbahn in *Drosophila* bislang nicht identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wird das Gen *bällchen* (*ball*) vorgestellt und charakterisiert. Es wurde mit einem "Yeast Two Hybrid-Screen", der für *Drosophila* Par-1 durchgeführt wurde, identifiziert (Klinge, Diplomarbeit). Erste Sequenzanalysen ergaben, dass es vermutlich für eine Kinase kodiert und damit möglicherweise eine Bedeutung in der Signaltransduktion besitzt. Darüber hinaus wurde mein Interesse durch ein spezifisches Expressionsmuster im Embryo geweckt: *ball* wird in den embryonalen Stammzellen des Nervensystems und der Keimbahn exprimiert. Im Folgenden werden eine molekulare und genetische Charakterisierung dieses Gens und seine mögliche Funktion für die Stammzellentwicklung beschrieben. Die Funktionsanalyse wurde in Bezug zur männlichen Keimbahnentwicklung durchgeführt und kann möglicherweise sowohl auf die weibliche Keimbahnentwicklung als auch auf die Neuroblastenentwicklung übertragen werden. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass *ball* für eine Stammzell-spezifische Kinase kodiert, die entweder für den Erhalt des Stammzellcharakters oder die Proliferation von Stammzellen während der Keimzellentwicklung von *Drosophila* von Bedeutung ist.

2 Ergebnisse

Das in dieser Arbeit vorgestellte Gen ist von FlyBase (<http://flybase.org/>) unter der Flybase Identifizierungsnummer FBgn0027889 annotiert. Es ist an Position 97D auf dem rechten Arm des dritten Chromosoms lokalisiert und hat eine vorhergesagte Länge von 2202 Basenpaaren (Bp). Aufgrund des mutanten Phänotyps (siehe 2.6.1) erhielt dieses Gen den Namen *bällchen* (*ball*).

2.1 Molekulare Charakterisierung von *bällchen* (*ball*)

Über Datenbankanalysen (NCBI BLAST; <http://flybase.net/blast/>) wurden für *ball* mehrere ESTs (Expressed Sequence Tags) identifiziert. Ein Vergleich der Sequenzen dieser cDNAs mit der genomischen Region von *ball* ergab zwei mögliche Transkripte, *ball*-PA (FlyBase ID: FBtr0085095) und *ball*-PB (FlyBase ID: FBtr0085096), bestehend aus 3 bzw. 2 Exons (Abb. 2.1 A, B). Die Transkripte unterscheiden sich in ihrem nicht kodierenden 5'-Bereich. Das Transkript *ball*-PA besitzt eine 133 Bp lange Sequenz vor dem Translationsstart (Abb. 2.1 A). Diese Basensequenz ist von einem Intron unterbrochen (Abb. 2.1 B). Das prozessierte *ball*-PA-Transkript hat eine Gesamtlänge von 2027 Bp. Das zweite Transkript, *ball*-PB, ist 2049 Bp lang, 185 Bp davon befinden sich im 5'-Bereich vor dem Translationsstart (Abb. 2.1 A). Diese 5'-Sequenz ist nicht von einem Intron unterbrochen (Abb. 2.1 B). Beide Transkripte enthalten den gleichen offenen Leserahmen (OLR) mit einer Länge von 1800 Bp (Abb. 2.1 A, B). Die Sequenz des Leserahmens konnte durch die Sequenzierung des cDNA-Klons LD27410 (siehe 4.2.7) bestätigt werden (Abb. 2.1 A).

Der OLR kodiert für ein 599 Aminosäuren (As) langes mutmaßliches Protein (FBpp0084465; Abb. 2.2 A) mit einer vorhergesagten Größe von 65,9 kDa. Mit Hilfe von Analyseprogrammen (siehe 4.2.3) konnte eine Serin/Threonin-Kinasedomäne im *ball*-Protein identifiziert werden. Die Kinasedomäne erstreckt sich von As 46-328 (Abb. 2.2 A, B). Ihre Aktivität wurde *in vitro* in einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung (Aihara et al., 2004) nachgewiesen. Mögliche Phosphorylierungsstellen zur Regulierung der Kinaseaktivität sind vor allem im C-terminalen Bereich (As 329-599) von *ball* zu finden (Abb. 2.2 A in grün).

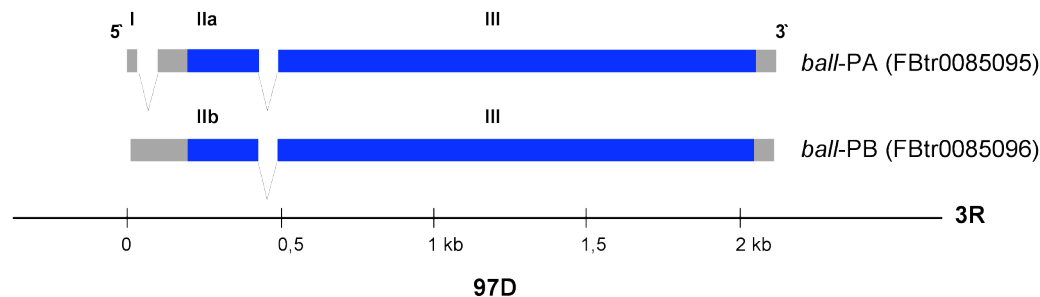
A

```

CAAGTGGCGCCGTTTTGTCAGAGCTGTCTATCGTAATATATCCTTGAAATCATAATCATCCTTTTTTATTTTTATGTTTCA 80
ATGACTCGGGCAACAGCCCTGGAAATACGTCTGTTTTTACAAGTAGTCTACTGGGTATATTTTTTTTTTAAAGCTGTCACCTC 160
ACTTGACAACCTGAAGGACGCTACTCCCGCGCCGATTGGCAACCTGTATGGCCCGGCATTTCGAGCGGAATTTGCGGAA 240
TATTATACTTGGCCGCTATTTAACGACGATCTTGCCAGAGAAATGCCGCGTGTAGCCAAAGCCGAAAGCCGCTCCGGC 320
CAAGAAGGTGGTGTGCGCCAAGAAGGCCAAGAGCAAGCTGTACAAGATGCCGGAGAAGGTGAAGGAGGGCACAGTTTTCA 400
CCGATTTAGCCAAAGGCCAGTGGCGCATTTGGACCCTCGATCGGAGTTGGAGGATTTCGGTGAGATCTACGCGGCTTGCAAA 480
GTGGGTGAGAAGAATAACGATGCTGTGGTCAAATGCGTGAGTGCCGCTCGTTTTTTTTTTGTGGAGATTGCTATTATAAA 560
TCGTATTTTTAGGAGCCACATGGCAATGGTCTCTGTCTGTTGGAGATGCACCTTCTACCTGCGCAACGCCAAGCTGGAGGA 640
CATCAAACAGTTTCATGCAGAAGCACGGTCTCAAGTCCCTGGGCATGCCCTACATACTGGCTAATGGTTCCGTTGGAGGTCA 720
ATGGTGAAGGACATCGATTTATAGTCATGCCGCGCTACGGCAGCGATTGACCAAGTTTCTGGAAACAGAACGGCAAGCGA 800
CTGCCCAGGGCACTGTCTACCGACTGGCCATTCAGATGCTGGACGTCTATCAGTACATGCACAGCAACGGCTACGTTCA 880
TGCCGATCTTAAGGCAGCCAACATACTGCTGGGCGCTGGAAAAAGGCGCGCTGCGCAGGCGTACCTGGTGGATTTCGGCC 960
TGGCTCACACCTTCGTCACCGGTGACTTCAAGCCGGAGCCCAAGAAGATGCATAATGGCACCATAGAAATACACATCAAGG 1040
GATGCTCATCTGGGCGTGCCAAACAGACGAGCTGATCTGGAGATCTCGGTTACAATCTCATCGAGTGGCTGGGCGCGGA 1120
GTTGCGGTGGGTACACGAGAACTACTGGCTGTACCCCCCAAGTTCAAAGGCCAAGGAAGCATTTATGGATAACATAG 1200
GCGAGAGTCTGAAGACGCTGTTCGGAAGGAGTGCCTCCGCGCAATTCGGGATTTTCATGAAGTATGCTCTCAAACTAACA 1280
CACAACAGGAGCCGACTACGACAAGTGTGCGAGTTGGTTCTCAAGTGCCTGAAGCAGCTGAAATTCCAAACAACGG 1360
AGATCTCGACTTTAAGATGAAGCCACAGACCAGCAGCAACAATAATCTAAGTCCGCGCGCACGAGCAAGGCAGCAACAG 1440
CCAGGAAAGCAAAAAAATGATTTCGCCAGTCTTGAACCTCATCACTGGACGAAAAAATCTCCGCCAGCGAAGATGATGAG 1520
GAGGAGGAGGAGAAGTCATCGCAAGAAGACGCCAAAAAGGTACCCCCATCAGCCCGAAACGCCAAGGTATCGCCCTT 1600
GAAGCGAGTCGCAGATAGTTCAACCCAGCCAGAAGCGCGTTAAGACTGAGCCCAAGTCAACACCCAGGGAGAGAGCTA 1680
GCCCCAAGGCCAGTCCCAAGCCAGGAGCACGCCGAGCCCAAGCCACAGACACCAACAGCAGCGCGCTCCGT 1760
ACTCCAATGCAAGATCAATTTCAAGCCGCTATTTTCGCTGCGTGGACGTCCCGGTGGCAAAACCGTGATCAACGATGA 1840
CCTCACTCCACAGCCGCGTTCCAAGAAGACCTATGAGTTTAACTTCGAGCTCGACGTTAGCATGGATGCCAACGTAATTG 1720
TGAATGTCAAACGCAAAAAGAACGCGACCAAGGATAGGCGAGCGGTTGATTACGTACACCCCTCATCCCGCAGCGCG 1800
TTGGCGTCCAGTTGCAAGGAGGAGGCGCTCACCTGTGACCCGAGTTAACTGCGCAAGGTAAACGGCCATGGCGACTCCTC 1880
CACGCCCGCGGTAGTCCGCGGACACCAGCCGTCACGTGTGCGGAAATACCAGGGATAGGAGCCTTTGTTTTCTGTATTTT 1960
TACATTTGTAACTCATTAATAAAAACTTGAAATATTTTCTT 2002

```

B

Abb. 2.1: Die genomische Organisation des *bällchen*-Lokus.

Darstellung der *ball*-Transkripte. Nichttranslatierte Transkriptbereiche sind schwarz, Intronsequenzen grau, der ORL in blau dargestellt. (A): Die *ball*-Transkripte unterscheiden sich in der vor dem Startcodon liegenden Sequenz. *ball*-PA (Flybase ID: FBtr0085095) beginnt mit Exon I (34 Bp), gefolgt von einer Intronsequenz (118 Bp). *ball*-PB (FlyBase ID: FBtr0085096) startet im 265 Bp langen Exon II. Dieses Exon beginnt 54 Bp (unterstrichen dargestellt) früher als bei *ball*-PA. Die folgende Intronsequenz und Exon III sind für beide Transkripte gleich. (B): *ball* ist im Bereich 97D im Genom lokalisiert. Das 2027 Bp lange Transkript *ball*-PA enthält drei Exons (I, IIa und III), das 2049 Bp lange Transkript *ball*-PB besteht aus zwei Exons (IIb und III). Beide Transkripte enthalten den gleichen, 1800 Bp großen ORL.

Das *ball*-Protein (Ball) weist hohe Ähnlichkeiten bezüglich der Sequenz und der vorhergesagten Proteinstruktur zu Mitgliedern der Familie der Vaccinia Related Kinases (VRK) auf. Innerhalb dieser Proteinfamilie sind die Sequenzähnlichkeiten zu den Homologen von VRK1 am größten (Abb. 2.2 B). Die Sequenzähnlichkeit beschränkt sich auf die Kinasedomäne. Diese ist zu 43% identisch mit VRK1 in Maus (SwissProt ID: Q80X41) und Zebrafisch (SwissProt ID: Q7ZUS1), 42% Identität bestehen zum humanen VRK1 (SwissProt ID: Q99986). Die N-terminalen und C-terminalen Bereiche von Ball sind nicht konserviert.

Außer Ball gibt es bei *Drosophila* noch ein weiteres vorhergesagtes Protein mit Ähnlichkeit zur Familie der VRK. Das kodierende Gen ist von FlyBase (<http://flybase.org/>) unter dem Namen *VRK* (FlyBase ID: FBgn0027504) annotiert. Die Sequenzübereinstimmungen beschränken sich auch hierbei nur auf die Kinasedomäne. Im vorhergesagten 1004 As langen Protein ist innerhalb der Kinasedomäne zwischen As 284 und As 515 eine 231As lange Sequenz integriert, die nicht konserviert ist. Die restliche Kinasedomäne ist zu 36% identisch zu Ball (Abb. 2.2 B).

A

```

MPRVAKPKAAAPAKKVVSAKKAISKLYKMPEKVKEGTVFTDLAKQWRIGPSIGVGGFGEIYAACKVGEKNYDAVVKCEP    80
HNGGPLFVEMHFYLRNAKLEDIKQFMQKHGLKSLGMPYILANGSEVNGEKHRFIVMPRYGSDLTKFLEQNGKRLPEGTV    160
YRLAIQMLDVYQYMHNSGYVHADLKAANILLGLEKGGAAQAYLVDFGLASHFVTGDFKPDPKMHNGTIEYTSRDAHLGV    240
PTRRADLEILGYNLIEWLGAELPWVTQKLLAVPPKVQKAKEAFMDNIGESLKTLPKGVPPPIGDFMKYVSKLTHNQEPD    320
YDKCRSWFSSALKQLKIPNNGDLDFKMKPQTSNNNLSPPGTSKAATARKAKKIDSPVLNSSLDEKISASEDEEEEEESK    400
HRKKTAKKVTPSARNAKVSPKRVADSSPPSQKRVKTEPKSTPRERATPKASPKPRSTPKASPKPQTPTAARLRTPNAKI    480
NFSPSISLRGRPGGKTVINDDLTPQPRSKKTYEFNFELDVSM DANVIVNVKRRKKADQDKATAVDSRTPSSRSALASSSK    560
EEASPVTRVNLKRVNGHGSSTPGRSPRTPAVTVRKYQG                                           640

```

B

| Bällchen | N-Term | Kinasedomäne | C-Term | |
|----------------------------|--------|--------------|--------|---------|
| humanes VRK1 | | | | 610 As |
| | | 42% | | |
| <i>M. musculus</i> VRK1 | | | | 440 As |
| | | 43% | | |
| <i>D. rerio</i> VRK1 | | | | 425 As |
| | | 43% | | |
| <i>D. melanogaster</i> VRK | | | | 1004 As |
| | | 36% | | |

Abb. 2.2: Die bällchen-Proteinsequenz und Homologe.

(A): Das 599 As große Protein enthält eine Serin/Threonin-Kinasedomäne (As 46-328 in rot). Das katalytische Zentrum (As 179-191) ist fett gedruckt, die ATP-Bindedomäne (As 53-77) ist unterstrichen dargestellt, mögliche Serin- bzw. Threoninphosphorylierungsstellen in grün. (B): Proteinsequenzvergleiche von Bällchen und VRK1-Homologen aus Mensch (SwissProt ID: Q99986), Maus (SwissProt ID: Q80X41) und Zebrafisch (SwissProt ID: Q7ZUS1) und *Drosophila* (FlyBase ID: FBpp0089096). Die Vaccinia Related Kinase1 (VRK1) besitzen eine hohe Sequenzidentität zu Bällchen bezüglich der Kinasedomäne (283 As). Sie beträgt 42 % für das humane VRK1, 43 % für VRK1 aus Maus bzw. Zebrafisch. Die Kinasedomäne von *Drosophila* VRK zeigt, nach Entfernung einer 231 As langen nicht konservierten Sequenz innerhalb der Kinasedomäne, eine 36 %ige Übereinstimmung mit Bällchen. Die N- und C-terminalen Bereiche der Proteine sind nicht konserviert.

Hinsichtlich ihrer zellulären Funktion sind die VRK1s wenig untersucht. VRK1 wird in Mensch und Maus in hochproliferierenden Geweben exprimiert (Nezu et al., 1997; Zelko et al., 1998). Phosphorylierungsstudien ergaben, dass humanes VRK1 den Tumorsuppressor P53 innerhalb der Bindestelle von Mdm2 *in vitro* phosphoryliert (Lopez-Borges und Lazo, 2000). In *C. elegans* konnte in RNAi-Experimenten gezeigt werden, dass *VRK1* essentiell für das Überleben des Embryos ist (Piano et al., 2002; Kamath et al., 2003). Ball selbst phosphoryliert *in vitro* Histon 2A (Aihara et al., 2004).

Diese Ergebnisse weisen auf wichtige Funktionen dieser Proteinfamilie bei der Proliferation hin.

2.2 Expressionsstudie des *ballchen*-Transkripts

Das Expressionsmuster der *ball*-mRNA während der verschiedenen *Drosophila*-Entwicklungsstadien wurde über *in situ*-Hybridisierung an Ganzpräparaten von Embryonen und Larvengewebe (siehe 4.3.3) ermittelt. Dabei wurde die mRNA mit spezifischen Sonden detektiert. Diese Sonden wurden durch *in vitro*-Transkription hergestellt (siehe 4.2.8). Je nach Transkriptionsrichtung wurde eine Sonde zur Detektion der mRNA im Gewebe ("antisense-Sonde") oder eine Sonde zur Negativkontrolle ("sense-Sonde") hergestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.3 zusammengefasst.

Der frühe Embryo enthält bereits maternal eingebrachtes *ball*-Transkript (Abb. 2.3 A) in hoher Konzentration. Von dieser zunächst ubiquitären Verteilung werden die bereits sehr früh am posterioren Pol gebildeten primären Keimzellen (PKZ; Sonnenblick, 1950) ausgeschlossen. *ball*-mRNA bleibt während der Streckung des Keimbands noch ubiquitär im Embryo nachweisbar (Abb. 2.3 B). Im weiteren Verlauf der Embryogenese wird *ball*-Transkript dann zunehmend auf das zentrale Nervensystem (ZNS) reduziert (Abb. 2.3 C-I). Das ZNS entwickelt sich aus dem Neuroektoderm (Hartenstein und Campos-Ortega, 1984; Campos-Ortega und Hartenstein, 1985). Vom embryonalen Entwicklungsstadium 8 an (Einteilung der Entwicklungsstadien nach Campos-Ortega und Hartenstein, 1985) delaminieren Neuroblasten (Wheeler, 1891; 1893) aus dem Neuroektoderm. Die Neuroblasten bilden die Stammzellen des ZNS. Aus ihnen gehen durch asymmetrische Teilungen die differenzierten Zellen des ZNS (die Gangliumutterzellen, die Neuronen und die Gliazellen) hervor (Doe and Goodman, 1985; Truman und Bate, 1988; Schmid et al., 1999). *ball*-mRNA bildet im sich entwickelnden ZNS ein zeitlich dynamisches Muster. An diesem Muster sind die Neuroblasten, erkennbar an ihrer Größe (Doe, 1992), beteiligt (Abb. 2.3 G,H). Die Expression im ZNS nimmt zum Ende der Embryogenese hin ab.

Neben der Expression im zentralen Nervensystem kann *ball*-mRNA auch in den embryonalen Gonaden nachgewiesen werden. Die Gonaden werden während der späten

Embryogenese aus den PKZ gebildet (siehe 1.3). Ab diesem Zeitpunkt kann die *ball*-mRNA in den Keimzellen eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 2.3 I, J).

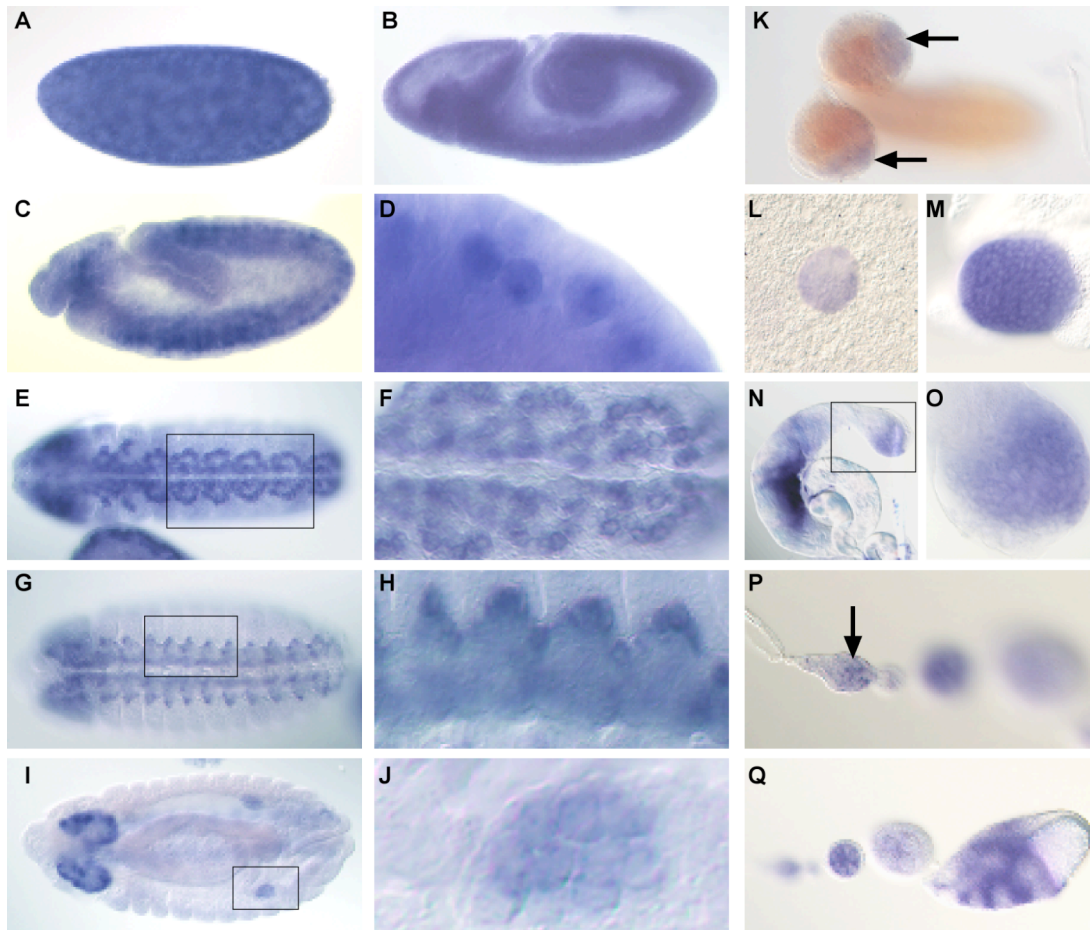


Abb. 2.3: Verteilung der *ball*-mRNA während der Entwicklung.

(A-J): *ball*-Expression während der Embryogenese. (A) Embryogenesestadium 3, ubiquitäre Verteilung der maternalen Transkripte mit Ausnahme der Polzellen (Pfeil). (B) Stadium 9, Konzentration der Transkripte auf das Keimband. (C,D) Stadium 11, Transkriptanreicherung im ZNS in Neuroblasten (siehe Ausschnittsvergrößerung in D). (E-H) dynamische *ball*-Expression im ZNS, Ventralansichten. (E,F) Stadium 11, *ball*-mRNA-Expression in Neuroblasten (siehe Ausschnittsvergrößerung in F). (G,H) Stadium 15, Abnahme der Expression im ZNS, Konzentration der Transkripte auf Neuroblastenpopulationen (siehe Ausschnittsvergrößerung in H). (I,J) Stadium 14, Die Expression in den Keimzellen beginnt gegen Ende der Embryogenese, Ausschnittsvergrößerung der Gonadenregion in J. (K-M): *ball*-Expression im dritten Larvenstadium. (K) *ball* wird schwach im Gehirn in den optischen Loben (Pfeile) exprimiert. Transkripte sind auch in weiblichen (L) und männlichen Gonaden (M) vorhanden. (N-Q): *ball*-Expression in adulten Tieren. (N,O) Transkripte sind nachweisbar in den runden Spermatogenesestadien im Testislumen und in der Testisspitze (Ausschnittsvergrößerung in O). (P,Q) *ball* wird während der Oogenese bereits im Germarium (Pfeil in P) und später in den Nährzellen (Q) exprimiert.

Die Expression von *ball* im Nervensystem und in der Keimbahn bleibt im Lauf der weiteren Entwicklung erhalten: Im dritten Larvenstadium kann *ball*-Transkript in den optischen Loben (Meinertzhagen und Hanson, 1993; Abb. 2.3 K) und in den Gonaden beider Geschlechter nachgewiesen werden (Abb. 2.3 L-O). Zu diesem Zeitpunkt hat in

den männlichen Gonaden bereits die Differenzierung der Keimzellen begonnen (siehe 1.3), die Oogenese dagegen beginnt erst während der Puppenentwicklung (Spradling, 1993). In adulten Gonaden wird die *ball*-Expression ebenfalls aufrechterhalten. Im Testis ist *ball*-mRNA in den frühen runden Entwicklungsstadien der Spermatogenese vorhanden (Abb. 2.3 N, O). Diese befinden sich in der Testisspitze, wo die Stammzellen lokalisiert sind, und füllen einen Teil des Testislumens (siehe 1.2 und 1.3). Ebenfalls früh beginnt die *ball*-Expression in der Oogenese. Die Entwicklung des Eis beginnt im Germarium, wo die somatischen Stammzellen und die Keimbahnstammzellen lokalisiert sind (King, 1970; Mahowald und Kambyssellis, 1980; Spradling, 1993). Das Germarium bildet mit den apikalen somatischen Terminalfilamentzellen die Spitze der Ovarienschläuche. Die Ovarien enthalten eine Reihe sich entwickelnder Eikammern. Ein Ovar enthält zwischen 16 - 20 Ovarien. Wie in Abbildung 2.3 P gezeigt wird *ball* bereits im Germarium exprimiert. Später kann *ball*-Transkript in den Nährzellen der entwickelnden Eikammern nachgewiesen werden (Abb. 2.3 Q). Dieses Expressionsmuster steht im Einklang mit dem maternalen Transkriptnachweis: Maternale mRNA wird während der Oogenese von den Nährzellen exprimiert und später an die Oocyte abgegeben (King, 1970).

2.3 Identifizierung des *bällchen*-Allels *ball*¹

2.3.1 Die Insertionsstelle des transposablen Elements EP0863

Über Sequenzanalysen konnte bei FlyBase (<http://flybase.org/>) die EP-Insertion EP0863 im *ball*-Gen identifiziert werden. Die dazugehörige Fliegenlinie (EP0863) wurde vom Szeged Stock Center (<http://expbio.bio.u-szeged.hu/fly/index.php>) bezogen. Die flankierenden DNA-Sequenzen der EP-Insertion wurden mittels genomischer PCR amplifiziert und sequenziert (siehe 4.2.3). In Abbildung 2.4 A ist die Lage des EP-Elements im *ball*-Gen gezeigt. Es inseriert 36 Bp vor dem Startcodon im transkribierten Bereich von *ball* in 5' sense Orientierung. Da es sich hierbei vermutlich um ein Allel von *ball* handelt, erhält die EP0863-Insertionslinie die Allelbezeichnung *ball*¹.

Die Insertion des EP-Elements im 5' gelegenen transkribierten Bereich von *ball* könnte eine Störungen der *ball*-Expression zur Folge haben. Dies wurde durch *in situ*-Hybridisierung (siehe 4.3.3) an Embryonenpräparaten (siehe 4.3.1) untersucht. Zur Unterscheidung von heterozygoten und homozygoten Embryonen wurde eine balanzierte *ball*^l-Linie verwendet, deren Balanzierchromosom das Markergen *lacZ* unter einem Promotor des *ultrabithorax*-Gens exprimiert. Die *lacZ*-Expression wurde durch eine zweite Sonde nachgewiesen. In Abbildung 2.4 sind *in-situ*-Färbungen von späten Entwicklungsstadien (Embryostadium 14) gezeigt, bei denen bereits die zygotische *ball*-Expression nachzuweisen ist. In homozygoten *ball*^l-Embryonen wird *ball* sichtbar im ZNS transkribiert (Abb. 2.4. B). Als Kontrolle diente eine Linie, in der das EP0863-Element, wie unter 2.3.2 beschrieben, revertiert und damit der Wildtypzustand wiedererlangt wurde (*ball*^{rev}). Im Vergleich zu Kontrollembryonen (Abb. 2.4 C) konnte in homozygoten *ball*^l-Embryonen keine Reduktion der Transkriptmenge beobachtet werden. Damit scheint die *ball*-Expression auf mRNA-Ebene zumindest im embryonalen ZNS nicht gestört.

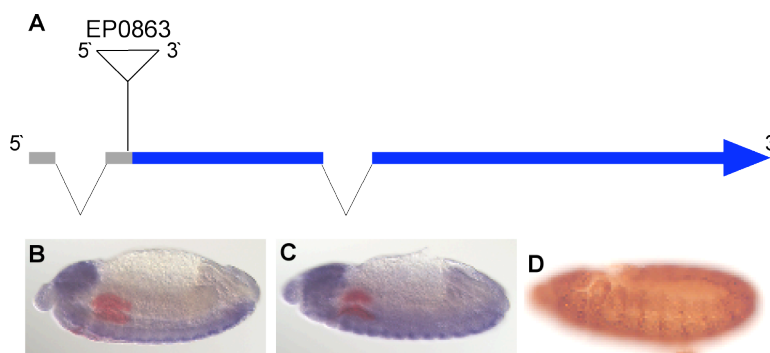


Abb. 2.4: Integration des EP0863-Elements im *bällchen*-Gen und Nachweis der EP-vermittelten *ball*-Expression.

(A): Das EP-Element inseriert in 5'-sense-Orientierung 36 Bp vor dem Translationsstart von *ball* (ORL in blau, abgebildete Transkriptvariante *ball*-PA in grau). (B,C): *in situ*-Hybridisierung einer *ball*-Sonde an Embryonen (embryonales Entwicklungsstadium 14). *ball*-mRNA ist im Nervensystem von homozygoten *ball*^l-Embryonen (B) und homozygoten *ball*^{rev}-Kontrollembryonen (C) nachweisbar. Die Embryonen zeigen darüber hinaus unspezifische Färbungen in rot, die von der *lacZ*-Kontrollsonde herrühren (D): Ektopische Expression von *ball* über UAS-Sequenzen des EP0863-Elements unter Kontrolle eines *engrailed*-Promotors. Nachweis von *ball*-Protein durch Anti-Ball-Antikörperfärbung an Embryonen (Entwicklungsstadium 11).

EP-Elemente enthalten in ihrem 3'-Bereich UAS-Sequenzen (Rorth et al., 1996), die bei Bindung des GAL4-Transkriptionsfaktors die Expression 3' gelegener Gene induzieren können. Das Hefe-Protein GAL4 wird dabei von "Treiberlinien" in Form von Transgenen bereitgestellt, in denen GAL4 unter Kontrolle von spezifischen Enhancern

gerichtet exprimiert wird (Fischer et al., 1988). Durch seine Lage kann das inserierte EP-Element theoretisch zur Induktion einer *ball*-Expression mit Hilfe des UAS/GAL4-Systems (Brand und Perrimon, 1993) genutzt werden.

Um die Induktion experimentell nachzuweisen, wurde das mutante *ball*¹-Allel mit Individuen einer *engrailed*GAL4-Treiber-Linie (Kornberg et al., 1985) gekreuzt und die *ball*-Expression mittels Antikörperfärbung von Embryo-Ganzpräparaten detektiert (siehe 4.2.15; 4.3.2; 4.3.4; 4.3.5). Wie in Abbildung 2.4 C gezeigt ist, detektiert der Anti-Ball-Antikörper *ball*-Protein ektopisch in den Expressionsdomänen der Treiber-Linie, das heißt in einer Serie von Streifen entlang der Längsachse des Embryos. Dass es sich dabei tatsächlich um eine ektopische und nicht um die im Wildtyp-Embryo ausgeprägte Expression handelt, wird im Vergleich der Expressionsmuster von Abbildung 2.4 C mit Abbildung 2.3 C, welches das natürliche Expressionsmuster von *ball* behandelt, deutlich. Damit ist das EP-Element EP0863 nach Aktivierung durch ektopisch exprimiertes GAL4-Protein in der Lage, die Expression von *ball*-Protein zu induzieren.

2.3.2 Die EP0863-Insertion ist verantwortlich für die Sterilität der Männchen

Die ursprüngliche EP0863-Insertions-Linie war homozygot letal. Da das betroffene Gen *ball* in dieser Insertions-Linie wie in Abbildung 2.4 B gezeigt weiterhin transkribiert wird, bestand die Möglichkeit, dass die Letalität von zusätzlichen Mutationen innerhalb des Genoms dieser Linie herrührte. Deshalb wurde die EP-Insertions-Linie zur weiteren genetischen und phänotypischen Analyse von möglichen weiteren Mutationen gereinigt. Dies wurde durch mehrmaliges Kreuzen einzelner Jungfrauen der EP0863-Insertions-Linie mit Männchen einer Linie, die eine Mutation im *white*-Gen (*w*) tragen (Linie Nr. 9, siehe 4.4.4 und 4.4.5) erreicht. Das EP-Element konnte über das Markergen *w* anhand der roten Augenfarbe durch die Kreuzungen hindurch verfolgt werden. Bei der gereinigten Linie zeigte sich, dass die Fliegen homozygot lebensfähig sind. Die homozygoten *ball*¹-Weibchen sind fertil, homozygote *ball*¹-Männchen sind jedoch zu 100% steril (siehe 4.4.1). Damit ist die Letalität der ursprünglichen

Insertionslinie nicht auf die EP0863-Insertion zurückzuführen. Die Sterilität des lebensfähigen *ball*^l-Allels ist auf die homozygoten Männchen beschränkt.

Für die spätere genetische Analyse war es ferner notwendig, das Insertions-tragende Chromosom zur Identifizierung mit weiteren Markern zu versehen. Dies wurde durch Kreuzung der mutanten *ball*^l-Linie mit einer Multimarkerlinie (siehe 4.4.4, Linie Nr. 26) und anschließender Rekombination erreicht (siehe 4.4.6). Als Ergebnis konnte eine Linie etabliert werden, die auf dem III. Chromosom neben der EP0863-Insertion noch die beiden rezessiven Markermutationen *ebony* (*e*), eine Mutation der Cutikularfarbe, und *roughoid* (*ru*), eine Mutation der Ommatidien, enthielt (siehe 4.4.4, Linie Nr. 24). Diese Markermutationen sind an den Stellen 93C (*e*) und 61F (*ru*) auf dem III. Chromosom im Genom lokalisiert (Lindsley und Zimm, 1992).

Um festzustellen, ob der Sterilitätsphänotyp von der Insertion des EP-Elements herrührt, wurde das Element remobilisiert (siehe 4.4.7 und 2.4.1). Durch das Einkreuzen einer transgenen Transposasequelle wurde das EP-Element in der F1-Generation zur Reversion angeregt. Bei erfolgter Reversion verloren die Nachkommen nach dem Auskreuzen der Transposasequelle wegen des Verlusts des Insertionsmarkers *w* die rote Augenfarbe. Eine basengenaue Reversion wurde durch Sequenzierung der ursprünglichen Integrationsstelle im *ball*-Genom (siehe 4.2.3) bestätigt. In dem so entstandenen Allel *ball*^{rev} ist die Sterilität der Männchen aufgehoben. Damit ist die EP-Insertion in *ball*^l als Ursache des Sterilitätsphänotyps nahe liegend.

2.3.3 Die EP0863-Linie ist ein Allel von *bällchen*

Da sich die EP0863-Insertion wenige Basenpaare vor dem OLR von *ball* befindet, besteht die Möglichkeit, dass die *ball*-Proteinexpression in dieser Linie gestört ist. Um zu klären, ob *ball* in einem ursächlichen Zusammenhang mit dem Sterilitätsphänotyp steht, wurde das Gen in den Gonaden der mutanten Fliegen überexprimiert. Hierfür wurde die Expression von *ball* wie schon in 3.3.1 über die UAS-Sequenzen des EP0863-Elements unter Zuhilfenahme des UAS/GAL4-Systems induziert (siehe 4.4.11). Dazu wurde das *ball*^l-Allel mit einer NGT40-Treiberlinie (Van Doren et al., 1998; siehe 4.4.4 und 4.4.11) verkreuzt. Diese Treiberlinie exprimiert GAL4 unter

Kontrolle eines *nanos*-Promotors in den Keimzellen (Schulz et al., 2004). Als Ergebnis dieser Kreuzung konnten Männchen gewonnen werden, die homozygot für die EP0863-Insertion und fertil waren (siehe 4.4.1). Die wiederhergestellte Fertilität der homozygoten Männchen durch die Expression von *ball* zeigt, dass dieses Gen für den Sterilitätsphänotyp der homozygoten Männchen der Insertionslinie verantwortlich ist. *ball*^l ist damit ein Allel von *ball*.

Da in diesem Allel die Expression von *ball*, wie in 2.3.1 gezeigt, zumindest auf Transkriptebene nicht erkennbar gestört ist, handelt es sich hierbei vermutlich um ein schwaches Allel von *ball*. Für eine phänotypische Analyse von *ball*-Mutanten war es daher notwendig, weitere Funktionsverlustmutationen für dieses Gen herzustellen.

2.4 Herstellung weiterer Allele von *bällchen*

2.4.1 Ergebnisse des Reversions-Screens

Zur Herstellung eines Null-Allels von *bällchen* wurde ein "Reversions-Screen" (siehe 4.4.7) durchgeführt, bei dem das EP-Element, wie schon in 2.3.2 beschrieben, durch Einkreuzen einer Transposasequelle zum Herausspringen angeregt wird. Dabei kann es mit der Entfernung des EP-Elements auch zu Deletionen angrenzender genomischer DNA-Bereiche kommen. Aus der F1-Generation wurden daher Männchen, welche die Transposase und EP-Insertion enthielten, als potentielle Reversions-Kandidaten mit Jungfrauen einer Balanzierlinie zur Etablierung stabiler Linien gekreuzt. Nach erfolgreicher Ablage wurde die DNA dieser Männchen präpariert (siehe 4.2.2) und die Reversion des EP-Elements über genomische PCR analysiert (siehe 4.2.3). Dazu wurden Primerkombinationen gewählt, welche die beiden Enden des EP-Elements (Primerpaare PR/P und PF2/P; siehe 4.2.11) und die genomische Region der Insertionstelle in Wildtyp-DNA (Primerpaar PF2/PR; siehe 4.2.11) nachweisen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst. Von den insgesamt 65 Kandidatenlinien war es danach in 48 Fällen zu einer Reversion des EP-Elements gekommen, ohne dass wesentliche angrenzende Bereiche (<50 Bp) im Genom mitbetroffen waren. Neun dieser Linien wurden auf Fertilität bei homozygoten

Männchen getestet, mit dem Ergebnis, dass die Männchen fertil waren. Die basengenaue Reversion des EP-Elements wurde durch Sequenzierung des Insertionsbereichs bei einer dieser Linien (JO-Linie Nr. 10, entspricht *ball^{rev}*; siehe 2.3.2) bestätigt.

| JO-Linie Nr. | PCR | | | homozygot lebensfähig / fertil |
|--------------|---------------|-------------|--------------|--------------------------------|
| | PR/PF2 344 Bp | PR/P 196 Bp | PF2/P 208 Bp | |
| 1 | ca 1500Bp | + | + | + / + |
| 2 | + | - | - | + |
| 3 | + | - | - | + |
| 4 | - | + | + | + / - |
| 5 | + | - | - | + |
| 6 | + | - | - | + |
| 7 | + | - | - | + |
| 8 | + | - | - | + |
| 9 | + | - | - | + |
| 10 | + | - | - | + / + |
| 11 | + | - | - | + |
| 12 | - | + | + | + / - |
| 13 | + | - | - | + / + |
| 14 | + | - | - | + / + |
| 15 | + | - | - | + |
| 16 | + | - | - | + |
| 17 | + | - | - | + |
| 18 | + | - | - | + |
| 19 | + | - | - | + / + |
| 20 | ca 390 Bp | - | - | + / + |
| 21 | ca 390 Bp | - | - | + / + |
| 22 | + | - | - | + |
| 23 | + | - | - | + |
| 24 | - | + | + | + / - |
| 25 | - | + | - | - |
| 26 | - | - | + | - |
| 27 | + | - | - | + |
| 28 | + | - | - | + |
| 29 | + | - | - | + |
| 30 | + | - | - | + |
| 31 | + | - | - | + |
| 32 | + | - | - | + |
| 33 | + | - | - | + |
| 34 | ca 390 Bp | - | - | + / + |

| JO-Linie Nr. | PCR | | | homozygot lebensfähig / fertil |
|-------------------------|---------------|-------------|--------------|--------------------------------|
| | PR/PF2 344 Bp | PR/P 196 Bp | PF2/P 208 Bp | |
| 35 | + | - | - | + / + |
| 36 | + | - | + | + / + |
| 37 | + | - | - | + |
| 38 | + | - | - | + |
| 39 | ca 390 Bp | - | - | + / + |
| 40 | + | - | - | + / + |
| 41 | + | - | - | + |
| 42 | + | - | - | + |
| 43 | - | - | - | + / + |
| 44 | - | - | - | + / + |
| 45 | + | - | - | + / + |
| 46 | + | - | - | + / + |
| 47 | ca 390 Bp | - | - | + / + |
| 48 | + | - | - | + / + |
| 49 | + | - | - | + |
| 50 | + | - | - | + |
| 51 | + | - | - | + |
| 52 | + | - | - | + |
| 53 | + | - | - | + |
| 54 | + | - | - | + |
| 55 | + | - | - | + |
| 56 | + | - | - | + |
| 57 | + | - | - | + |
| 58 | - | + | + | + / - |
| 59 | - | + | + | + / - |
| 60 | + | - | - | + |
| 61 | + | - | - | + |
| 62 | - | + | + | + / - |
| 63 | + | - | - | + |
| 64 | + | - | - | + |
| 65 | + | - | - | + |
| <i>ball^l</i> | - | + | + | + / - |
| Wild-typ | + | - | - | + / - |

Tabelle 2.1: PCR-Ergebnisse des Reversions-Screens.

Detektion des 3'EP-Endes mit Primerpaar PF2/P, des 5'EP-Endes mit Primerpaar PR/P und der Region der EP-Insertion in Wildtyp-DNA mit Primerpaar PF2/PR. JO-Linien, die keine Deletion zeigen sind hellgrau hinterlegt. Dunkel hervorgehoben sind JO-Linien, in denen das EP-Element teilweise entfernt wurde. Darunter befinden sich zwei lethale JO-Linien (gelb).

In sechs Linien waren noch beide EP-Enden vorhanden. Die homozygoten Männchen waren jedoch steril. Hier scheint keine vollständige Exzision des EP-Elements stattgefunden zu haben.

In neun Fällen kam es laut PCR-Analyse zu einer teilweisen Entfernung des EP-Elements. Mit Ausnahme von zwei Linien (JO-Linie Nr. 25 und 26; siehe 2.4.2 und 2.4.3) erwiesen sich die Männchen aber als homozygot fertil. Da die Sterilität bei Männchen den *ball*-Phänotyp darstellt (siehe 2.3.2), wurden diese Linien nicht weiter analysiert. Die JO-Linien Nr. 25 und Nr. 26 waren dagegen homozygot letal und könnten daher stärkere Allele von *ball* darstellen. Sie erhalten die Allelnamen *ball*² (JO-Linien Nr. 25) und *ball*³ (JO-Linien Nr. 26).

2.4.2 Southern-Blot-Analyse der *ball*-Allele

Für die beiden letalen Linien wurde zunächst eine Southern-Blot-Analyse (siehe 4.2.13) durchgeführt, um den Bereich der Deletion einzugrenzen. Eine schematische Darstellung der verwendeten Sonden mit der entsprechenden Restriktionskarte der genomischen DNA ist in Abbildung 2.5 A gezeigt. Die Sonden und Restriktionsenzyme wurden so gewählt, dass die Präsenz der ans EP-Element angrenzenden genomischen Bereiche überprüft werden konnte (Sonden Nr. 1 und 2). Zusätzlich wurde eine Sonde verwendet, die den 3'-genomischen Bereich von *ball* nachweist (Sonde Nr. 3) und eine Sonde, die das in 5'-Richtung benachbarte Gen *his2av* detektiert (Sonde Nr. 4).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.5, B-E dargestellt. Das Allel *ball*² zeigt im 5'-Bereich vor der EP-Insertion (Abb. 2.5 B und D; Sonden Nr. 1 und 4) keine Abweichungen im Bandenmuster von der Kontroll-DNA (Linie *ball*¹ balanziert). Das Bandenmuster der Sonden Nr. 2 und 3 (Abb. 2.5 C und E) zeigt allerdings, dass eine kleine genomische Defizienz, die den 5'-Bereich des *ball*-ORL beinhaltet, vorhanden ist. Das EP-Element muss dabei zu einem Großteil mit entfernt worden sein.

Bei dem Allel *ball*³ zeigen die Sonden Nr. 2, 3 und 4 (Abb. 2.5 C und E) keine Abweichungen im Bandenmuster. Daher sind der 3'-Bereich des EP-Elements und die Sequenz des *ball*-ORL bei dieser Linie nicht betroffen. Die Sonden Nr. 1 und 4 dagegen detektieren nur die Wildtypbande (Abb. 2.5 B und D). Damit enthält diese Linie eine genomische Defizienz im 5'-Bereich vor der EP-Insertion. Die Größe der Defizienz ist nicht eindeutig festzustellen, sie umfasst aber mindestens den 5'-Bereich des nächstgelegenen Gens *his2Av* (Abb. 2.5 A).

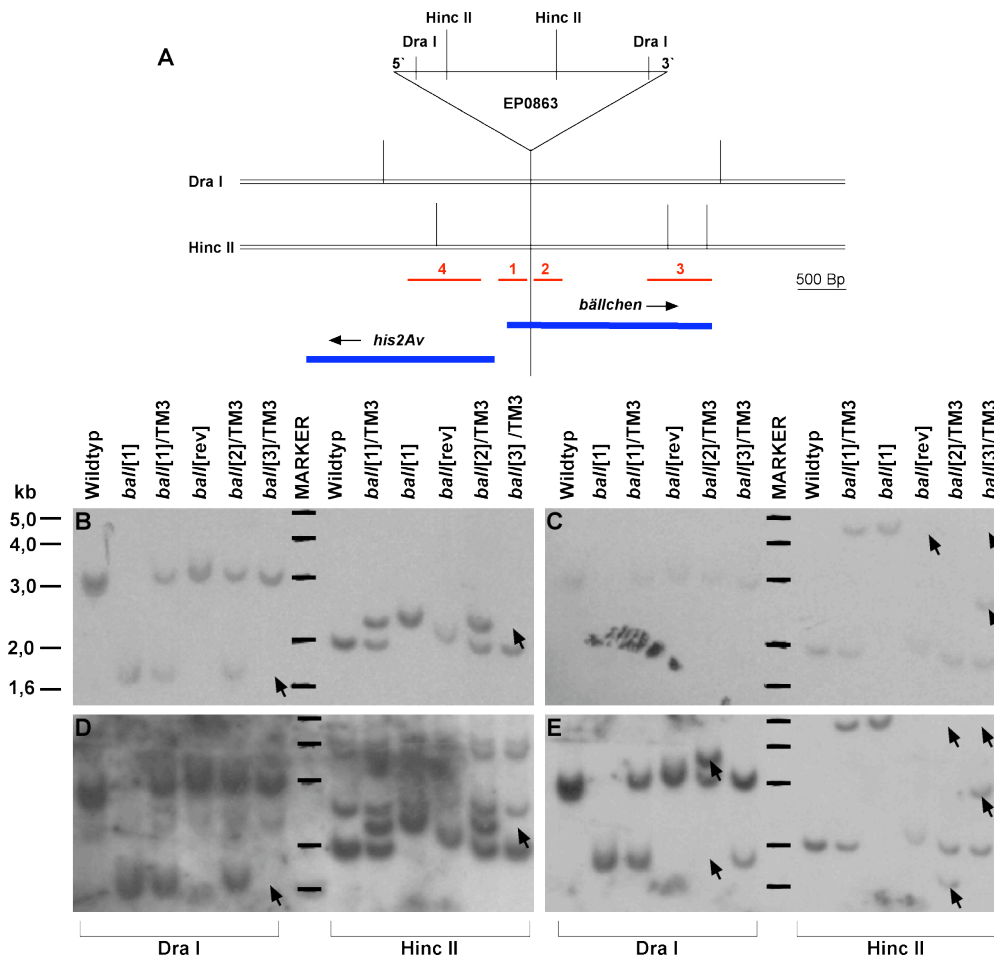


Abb. 2.5: Detektion von Deletionen genomischer Bereiche in den *ball*-Allelen.

(A): Darstellung der verwendeten Sonden und der Restriktionsschnittstellen (Enzyme Dra I und Hinc II) für den genomischen Bereich der EP0863-Insertion. Nummerierung 1-4: Bezeichnungen der Hybridisierungssonden. Sonden 1 und 2 detektieren genomische Bereiche, die direkt an die EP-Insertion grenzen. Sonde 3 ist gegen den 3'-Bereich von *ball* gerichtet. Sonde 4 detektiert den 5'-Bereich des benachbarten Gens *his2Av*. (B-E): Ergebnisse des Southern-Blots. Die Blots zeigen verdauten genomischen DNA von: Wildtyp, *ball*¹ homozygot, *ball*¹ heterozygot, *ball*^{rev} homozygot, *ball*² heterozygot und *ball*² heterozygot. Detektiert wurde mit den Sonden 1 (B), Sonde 2 (C), Sonde 4 (D), Sonde 3 (E). Veränderungen im Bandenmuster der heterozygoten Allele *ball*² und *ball*³ im Vergleich zu *ball*¹ (heterozygot) sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

2.4.3 Bestimmung der Bruchpunkte der Defizienz in *ball*²

Die Eingrenzung der Defizienz erlaubte für *ball*² die Herstellung von Primern (EP1 und N-Term3'; siehe 4.2.11), um dann den genomischen Bereich der Defizienz weiter einzugrenzen. Die Bruchpunkte der Defizienz konnten durch die anschließende Sequenzierung genau bestimmt werden. Vom EP-Element wurde ein Großteil entfernt: Von der insgesamt 7,969 kbp umfassenden Insertion sind nur noch 2,697 kbp des 5'-Bereichs vorhanden. Aus der genomischen Sequenz wurden, wie in Abbildung 2.6 A

A

5' (.....) 3'

100 Bp

B

```
CAAGTGGCGCCGTTTTCAGAGCTGTCTATCGTAATATATCCTTGAAATCATAATCATCCTTTTTTATTTTTATGTTTCA 80
ATGACTCGGCAACAGCCCTGGAAATACGTCGTTTTTACAAGTAGTCCTACTGGGTTATATTTTTTTTTTAAGCTGTCACTC 160
ACTTGACAACCCCTGAAGGACGCTACTCCCCGCGCCGATTGGCAACCCCTGATGGCCCGGCATTTCGAGCGGAAATTTGCGAA 240
TATTATACTTGGCCGCTATTTAACGACGATCTTGCCCAAGAAATGCCCGGTGTAGCCAAGCCGAAAGCCGCCGCTCCGGC 320
CAAGAAGGTGGTGTCTGGCCAAGAAGGCCAAGAGCAAGCTGTACAAGATGCCGGAGAAGGTGAAGGAGGGGCACAGTTTTC 400
CCGATTTTAGCCAAAGGCCAGTGGCGCATTTGGACCCTCGATCGGAGTTGGAGGATTCGGTGAGATCTACGCGGCTTGCAAA 480
GTGGGTGAGAAGAACTACGATGCTGTGGTCAAATGCGTGAGTGCCCGCTCGTTTTTTTTTTTGTGGAGATTGCTATTATAA 560
TCGTATTTTATAGGAGCCACATGGCAATGGTCCTCTGTGTCGTGGAGATGCACCTTCTACCTGCGCAACGCCAAGCTGGAGGA 640
```

C

D

(A): Vom EP-Element sind noch 2697 Bp des 5'-Bereichs vorhanden. Die angrenzende genomische Defizienz (gepunktete Linie) betrifft den 5'-transkribierenden Bereich von *ball* in Exon II. Translatierte Bereiche von *ball* in blau, Kinasedomäne in rot, ATP-Bindedomäne unterstrichen dargestellt. **(B):** genomische Sequenz von *ball*. Die Bruchpunkte der 152 Bp großen genomischen Defizienz (fett gedruckt) liegen 35Bp in 5'-Richtung vor dem Translationsstart (blau) von *ball* und 117 Bp in 3'-Richtung nach dem Translationsstart. Am 3'-Ende der Defizienz kam es zu einem Basenaustausch von T nach G (gelb), die ATP-Bindedomäne ist unterstrichen dargestellt. Das nächste Startcodon im gleichen Leserahmen (grün) befindet sich an Position 605 Bp in Exon III. **(C,D):** Nachweis von *ball*-mRNA in homozygoten *ball*^{rev}-Kontrollembryonen (C) und homozygot mutanten *ball*²-Embryonen (D). Die Embryonen zeigen darüber hinaus unspezifische Färbungen in rot, die von der *lacZ*-Kontrollsonde herrühren.

- 32 -

2.4.4 Genetische Charakterisierung der *ball*-Allele

Für die *ball*-Allele wurden Komplementationstests zur Feststellung der Allelstärken durchgeführt. Dazu wurden zunächst die neu hergestellten Allele *ball*² und *ball*³ und das bereits bekannte Allel *ball*¹ untereinander verkreuzt. Als Kontrolle diente das Wildtypallel *ball*^{rev}. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

| Genotyp | Lebensfähigkeit | Fertilität | |
|---|-----------------|------------|----------|
| | | Weibchen | Männchen |
| <i>ball</i> ¹ | vital | fertil | steril |
| #25 | pupal letal | | |
| #26 | larval letal | | |
| #10 | vital | fertil | fertil |
| <i>ball</i> ¹ /#25 | vital | fertil | steril |
| <i>ball</i> ¹ /#26 | vital | fertil | steril |
| #25/#26 | vital | fertil | steril |
| <i>ball</i> ¹ /Defizienz | vital | fertil | steril |
| #25/Defizienz | pupal letal | | |
| #26/Defizienz | larval letal | | |
| <i>ball</i> ¹ / <i>his2Av</i> ⁸¹⁰ | vital | fertil | fertil |
| #25/ <i>his2Av</i> ⁸¹⁰ | vital | fertil | fertil |
| #26/ <i>his2Av</i> ⁸¹⁰ | larval letal | | |

Tabelle 2.2: Allelitätstest der *ball*-Allele

Die allelischen Kombinationen der Allele *ball*² und *ball*³ mit *ball*¹ spiegeln den männlichen Sterilitätsphänotyp von *ball*¹ wieder. Damit sind beide Reversionslinien Allele von *ball*. Die Allelstärken wurden durch Kreuzung mit einer Linie bestimmt, die eine größere Defizienz im Bereich 97B-E (siehe 4.4.4, Linie Nr. 8) enthält und als Nullallel von *ball* diente. *ball*² ist während der Puppenentwicklung homozygot letal. Die Letalität ändert sich nicht in der allelischen Kombination mit der Defizienz. Damit verhält sich *ball*² genetisch wie ein Amorph.

*ball*¹ ist in Kombination mit der Defizienz lebensfähig, der Sterilitätsphänotyp ist weiterhin auf die Männchen beschränkt. Gleiches gilt für die allelische Kombination mit *ball*². Damit ist *ball*¹ kein Nullallel und schwächer als *ball*² (siehe auch 2.3.3).

*ball*³ wird aufgrund des Sterilitätsphänotyps in der allelischen Kombination mit *ball*¹ ebenfalls als schwaches Allel von *ball* eingeordnet. Entsprechend den molekularen Daten handelt es sich bei dieser Linie außerdem um ein Allel des in 5'-Richtung benachbarten Gens *his2Av*, da die Kombination von *ball*³ mit einem *his2Av*-Nullallel

(Clarkson und Saint, 1999; siehe 4.4.4) letal ist. *ball*¹ und *ball*² zeigen hingegen in Kombination mit dem *his2Av*-Nullallel keine Verstärkung der Phänotypen und scheinen damit, in Übereinstimmung mit der molekularen Analyse (siehe 2.4.2; 2.4.3), keine Allele des Gens zu sein. Da es sich bei *ball*³ nicht um eine *his2Av*-Doppelmutante handelt, wird dieses Allel in der folgenden phänotypischen Analyse nicht mehr berücksichtigt. Die Analyse bezieht sich daher auf das letale Amorph *ball*² unter Zuhilfenahme des hypomorphen homozygot lebensfähigen Allels *ball*¹.

2.5 Allgemeine phänotypische Analysen von *bällchen*

2.5.1 Letale Phase und Puppenentwicklung

Die Entwicklung von homozygoten *ball*²-Larven kann bis zur Puppenbildung verfolgt werden. In den Puppen scheint allerdings keine sichtbare Gewebsneubildung zu erfolgen: Die Puppenhüllen sind am Ende der Entwicklung leer (nicht abgebildet).

Um zu sehen, ob die letale Phase auf die Puppenentwicklung begrenzt ist, wurde die Sterblichkeit der *ball*-Mutanten im Verlauf der Embryonalentwicklung ermittelt. Zur Unterscheidung von homozygoten und heterozygoten Tieren während der Entwicklung wurde ein Balanzierchromosom (siehe 4.4.4; Linie Nr. 4) verwendet, das den sichtbaren Marker Green Fluorescent Protein (GFP) ubiquitär exprimiert und so die Unterscheidung an lebenden Tieren erlaubte. Bei den Ablagen dieser Fliegenlinien wurde der Prozentsatz nicht geschlüpfter Nachkommen bestimmt (siehe 4.4.2). Bei einer Zufallsverteilung der Chromosomen nach dem Mendelschen Prinzip sind je 25% der Embryonen homozygot für das *ball*²-Allel bzw. für das Balanzierchromosom. Das Balanzierchromosom ist während der Embryonalentwicklung homozygot letal. 50% der Embryonen sind heterozygot. In Abbildung 2.7 A ist die embryonale Letalität von Ablagen einer homozygoten *ball*^{rev}-Kontrolllinie, dem balanzierten *ball*²-Allel und einer Kreuzung aus balanzierter *ball*²-Allel mit balanzierter Defizienz (siehe 4.4.4) gezeigt. Die Defizienz diente dabei als Nullallel von *ball*. Gezählt wurden die nicht geschlüpften Embryonen einer 100 Embryonen umfassenden Gesamtablage. Aus der Kontrollablage des homozygoten *ball*^{rev}-Allels schlüpften 8% der abgelegten Eier nicht. Diese Zahl beinhaltet auch unbefruchtete Eier. Die Ablage des balanzierten *ball*²-Allels enthielt

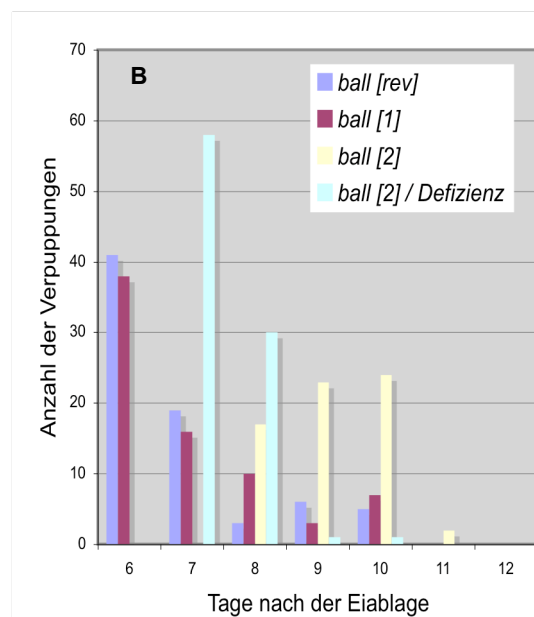
26% nicht geschlüpfte Embryonen. Die Zahl entspricht dem Prozentsatz der letalen homozygoten Balancier-Individuen in der Ablage. Gleiches gilt für die Ablage der Kreuzung aus balanzierten *ball*²-Jungfrauen mit der Männchen der balanzierten Defizienzlinie. Hier betrug die Letalität der Embryonen 31%. Im Vergleich zur Kontrollablage kann auch für mutante Embryonen des Genotyps *ball*²/Defizienz keine Zunahme der Letalität beobachtet werden.

A

| Genotyp | Embryonale Letalität [%] (n = 100) |
|---|---------------------------------------|
| <i>ball</i> ^{rev} | 8 |
| <i>ball</i> ² /TM3 | 26 |
| <i>ball</i> ² /TM3 x Defizienz/TM3 | 31 |

Abb. 2.7: Letale Phase und Entwicklungsverzögerung der *bällchen*-Allele.

(A): Bestimmung der embryonalen Sterblichkeit in den Fliegenlinien des homozygoten *ball*^{rev}-Allels (Kontrolle), des balanzierten Allels *ball*² und der Kreuzung aus *ball*² balanziert mit balanzierter Defizienz. Die Eiablagen enthielten je 100 Embryonen. (B): Bestimmung der Entwicklungsdauer bis zur Verpuppung von jeweils 100 homozygoten Larven der *ball*-Allele *ball*^{rev}, *ball*¹, *ball*² sowie *ball*²/Defizienz.



Um festzustellen, ob die mutanten *ball*-Allele zu einer erhöhten Letalität während der Larvenentwicklung führen, wurden jeweils 100 homozygote Larven der mutanten *ball*-Allele, des *ball*^{rev}-Kontrollallels und des *ball*²-Allels, welches mit der Defizienz kombiniert war, nach dem Schlüpfen in Fliegenröhrchen bis zur Puppenentwicklung inkubiert. Von den Kontrolltieren und den homozygot mutanten *ball*¹-Larven überlebten je 74% bis zur Puppe. Die Überlebensrate der mutanten *ball*²/Defizienz-Tiere betrug 90% und die des homozygot mutanten *ball*²-Allels 66%. Damit ist eine leichte Zunahme der Letalität für das homozygot mutante *ball*²-Allel feststellbar. Ferner ist bei den mutanten *ball*²-Individuen die Larvenentwicklung verzögert. Die Kontrolllarven und die homozygot mutanten Larven des *ball*¹-Allels begannen sechs Tage nach der Eiablage mit der Verpuppung. Bei den mutanten *ball*²/Defizienz-Tieren verzögerte sich die

Entwicklung um durchschnittlich einen Tag, bei den homozygot mutanten *ball*²-Individuen um zwei Tage.

2.5.2 Untersuchungen zur embryonalen Funktion von *bällchen*

Da *ball* bereits im Embryo zygotisch im zentralen Nervensystem (ZNS) und in den Gonaden exprimiert wird (siehe 2.2), besteht die Möglichkeit, dass *ball*-Mutanten embryonale Phänotypen ausbilden. Dies gilt insbesondere für das letale Allel *ball*², bei dem der zygotische Transkriptanteil nicht mehr nachweisbar ist (siehe 2.4.3). Zur Unterscheidung von heterozygoten und homozygoten *ball*-mutanten Embryonen wurden die Allele mit einem Balanzierchromosom versehen, welches das β -Galactosidase (β -Gal) kodierende *LacZ*-Gen unter einem Promotor der Gene *ultrabithorax* beziehungsweise *fushi-tarazu* exprimiert (siehe 4.4.4). Die β -Gal-Expression wurde dann mit Antikörperfärbungen nachgewiesen (siehe 4.3.4 und 4.3.5). Mögliche Effekte von *ball* auf die Entwicklung der PKZ im Embryo könnten Störungen der Migration, den Verlust der Identität oder das Absterben der PKZ beinhalten. In allen Fällen hätte dies eine Reduktion der Anzahl an PKZ zur Folge, die im späten Embryo in die Gonaden integriert werden. Diese Zahl wird für Wildtypembryonen mit 8-10 PKZ pro Gonade (Technau und Campos-Ortega, 1986) bzw. 14 PKZ pro Gonade (Hay et al., 1988) angegeben. Um festzustellen, ob die Keimzellentwicklung im *ball*²-Embryo betroffen ist, wurde die Anzahl der PKZ bestimmt, die im embryonalen Entwicklungsstadium 14 in die Gonaden integriert wurden (siehe 1.3 und 4.3.4). Als Marker für die Keimzellen diente *vasa*-Protein (Hay et al., 1988a, 1988b; Van Doren et al., 1998). Es wurde mit polyklonalen Anti-Vasa-Antikörpern (A. Herzig, nicht publiziert) detektiert. Als Kontrolle dienten balanzierte, heterozygote *ball*²-Embryonen. Die Ergebnisse sind in Abb. 2.8 A aufgeführt. Sie zeigen, dass homozygot mutante *ball*²-Gonaden mit durchschnittlich 10,2 PKZ ($\pm 1,8$) pro Gonade nicht signifikant ($p < 0,08$) weniger Keimzellen enthalten als die balanzierten heterozygoten Kontrollembrionen mit durchschnittlich 11,0 ($\pm 1,4$) PKZ pro Gonade. Damit können keine eindeutigen Effekte bezüglich der embryonalen Entwicklung des ZNS und der PKZ im mutanten *ball*²-Allel festgestellt werden. Ein Grund dafür könnte eine starke maternale *ball*-Komponente sein. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass maternales

ball-Protein bis spät in die Embryonalentwicklung hinein zygotische Defekte maskiert. Ein Phänotyp bezüglich der Entwicklung der Keimzellen beziehungsweise des Nervensystems würde sich dann möglicherweise erst während der Larvenentwicklung manifestieren.

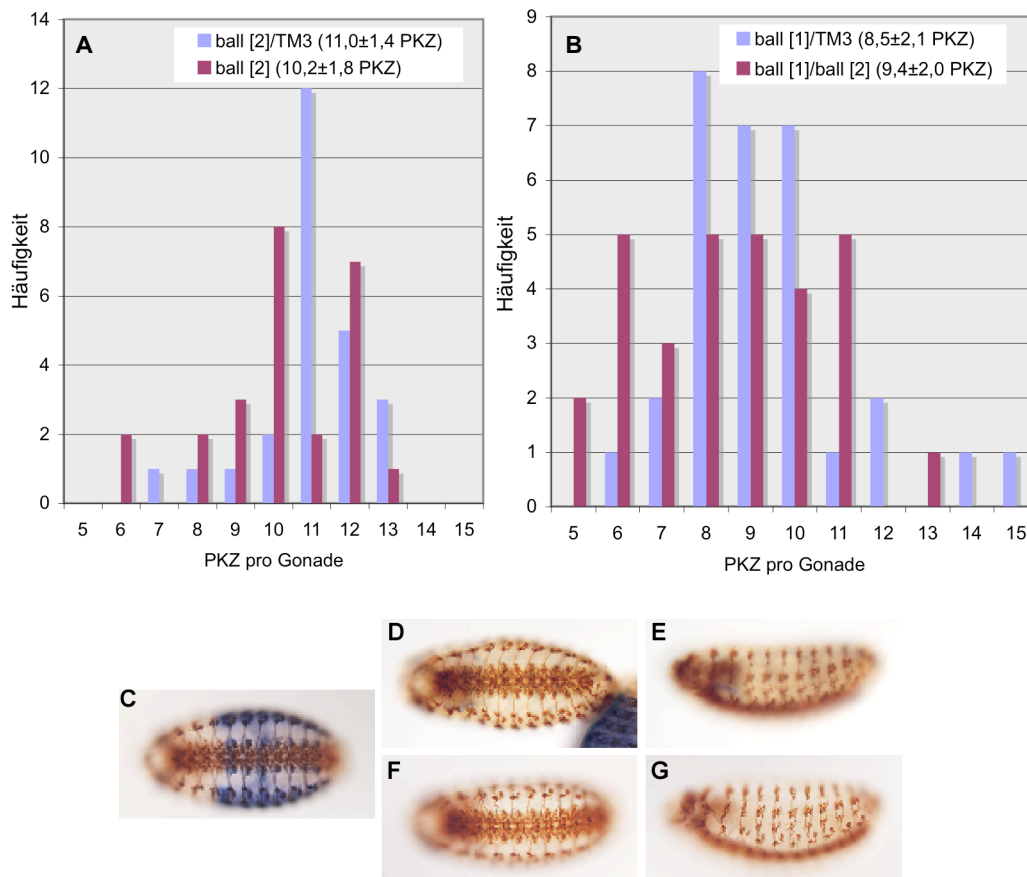


Abb. 2.8: Entwicklung der primären Keimzellen (PKZ) und des Nervensystems in mutanten *ball*-Embryonen. (A, B): Verteilung der Anzahl von PKZ, die im Embryonalstadium 13-14 in die Gonaden integriert wurden. In homozygoten *ball*²-Embryonen wurden im Durchschnitt 10,2 (\pm 1,8) PKZ pro Gonade integriert, die Kontrollembrionen (*ball*²/TM3) enthielten im Durchschnitt 11,0 (\pm 1,4) PKZ pro Gonade (A). Es wurden jeweils 25 Gonaden gezählt. Transheterozygote Embryonen (*ball*¹/*ball*²) enthielten im Mittel 9,4 (\pm 2,0) PKZ. Die Kontrollembrionen (*ball*¹/TM3) enthielten 8,5 (\pm 2,1) PKZ (B). Gezählt wurden jeweils 30 Gonaden. (C-G): mAb22C10-Antikörperfärbung des ZNS von Embryonen im Entwicklungsstadium 15. (C) Kontrolle: *ball*¹ balanziert, (D, E) *ball*², (F, G) transheterozygote *ball*¹/*ball*²-Embryonen, (C, D, F) Ventralansichten, (E, G) Lateralansichten.

Um die maternale Komponente im Embryo auszuschalten, wurden zunächst *ball*²-Keimbahnklone hergestellt (siehe 4.4.9). Mittels der sogenannten FRT/FLP-Technik (Chuo und Perrimon, 1992) wurden *ball*²-Klone in Keimzellen heterozygoter Weibchen induziert. Die Weibchen wurden dann mit Wildtyp-Männchen gekreuzt und zur

Eiablage angeregt (siehe 4.4.1). Die Induktion führte jedoch nicht zur Bildung von ablagereifen Eiern für eine phänotypische Analyse.

In einem zweiten Ansatz wurde dann versucht, die maternale Komponente durch Kreuzung der *ball*-Allele untereinander zu reduzieren. Dazu wurden homozygote Weibchen des hypomorphen Allels *ball*¹ mit balanzierten Männchen des letalen Allels *ball*² verkreuzt. Die Ablagen dieser Kreuzung wurden dann, wie oben beschrieben, auf Defekte in der Entwicklung des ZNS und der PKZ hin untersucht. In Abb. 2.8 B ist das Ergebnis dargestellt. Die Zählung der PKZ ergab eine durchschnittliche PKZ-Zahl von 9,4 ($\pm 2,0$) PKZ pro Gonade für die transheterozygoten *ball*¹/*ball*²-Embryonen. Balanzierte, heterozygote *ball*¹-Embryonen dienten als Kontrolle. Die Kontrollgonaden enthielten im Durchschnitt 8,5 ($\pm 2,1$) PKZ. Auch hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied ($p < 0,09$) in der Zahl der Keimzellen. Die Ergebnisse liefern damit keine Hinweise auf Störungen der embryonalen Keimzellentwicklung in transheterozygoten *ball*-Embryonen.

Gleiches gilt für die Entwicklung des ZNS. Gravierende Störungen in der Neuroblastenentwicklung könnten sich in strukturellen Defekten des embryonalen ZNS widerspiegeln. Als Marker für das Nervensystem diene das Protein von *futsch* (Hummel et al., 2000). Es wird von dem Antikörper mAb22C10 (Fujita et al., 1982) detektiert. In Abbildung 2.8 C-E sind Antikörperfärbungen des ZNS an *ball*²-Embryonen im Vergleich zu Kontrollembrionen (*ball*¹ balanziert) gezeigt (siehe 4.3.4 und 4.3.5). Dabei konnten keine Hinweise auf Störungen der neuronalen Projektion erhalten werden. Auch die transheterozygoten *ball*¹/*ball*²-Nachkommen zeigen bezüglich der Entwicklung des Nervensystems im Embryo keine Auffälligkeiten (Abb. 2.8 F, G).

Die transheterozygoten *ball*¹/*ball*²-Nachkommen entwickeln sich zu adulten Tieren. Sie zeigen den *ball*¹-Phänotyp, das heißt, die transheterozygoten *ball*¹/*ball*²-Männchen sind steril, die Weibchen dagegen fertil (siehe 2.4.4).

Da im Embryo kein eindeutiger *ball*-Aktivitätsverlust auf einfache Weise geschaffen werden konnte, konzentrierte sich die nachfolgend beschriebene Analyse des *ball*-Phänotyps auf die larvale und adulte Entwicklung, in der es unter zygotischen Funktionsverlust-Bedingungen zur Ausbildung von eindeutigen Phänotypen kommt.

2.5.3 *bällchen*-abhängige Defekte während der Larvenentwicklung

In der späten Larvenentwicklung werden Defekte in den *ball*-exprimierenden Geweben sichtbar. Während der Larvenentwicklung ist *ball*-Transkript in den optischen Loben des Gehirns (Meinertzhagen und Hanson, 1993) nachweisbar (siehe 2.2). Wie in Abb. 2.9 A-C gezeigt, sind in den späten Larvenstadien (siehe 4.3.3) Gehirne von homozygoten *ball*² Larven im Vergleich zu homozygoten *ball*¹-Larven und Kontrolllarven deutlich kleiner. Als Kontrolle dienten homozygote Larven des *ball*^{rev}-Allels, bei dem die Wildtypsituation durch Reversion der EP-Insertion wiederhergestellt wurde (siehe 2.3.2). Betroffen sind von der Reduktion vor allem die optischen Loben der homozygoten *ball*²-Larven. Imaginalscheiben (Cohen, 1993), aus denen adulte Strukturen während des Puppenstadiums hervorgehen, sind in homozygoten *ball*²-Individuen nicht auffindbar.

Auch in der Keimzellentwicklung wurden Defekte sichtbar. Die männlichen Gonaden sind während der Larvenentwicklung bereits ausgeprägt (Fuller, 1993; siehe 1.3) und lassen sich durch die Cuticula der lebenden Tiere beobachten. Wie in Abb. 2.9 D-F gezeigt, sind die männlichen Gonaden der homozygot mutanten *ball*-Allele kleiner als die Kontrollgonaden (*ball*^{rev} homozygot). Dieser Phänotyp ist ebenfalls im homozygot mutanten *ball*²-Allel verstärkt, das heißt, die Gonaden sind kleiner als die Gonaden der homozygoten *ball*¹-Larven.

Auffallend ist, dass die larvalen Phänotypen hochproliferative Gewebe wie z.B. die optischen Loben, die Keimzellen und die Imaginalscheiben betreffen. Dies legt die Vermutung nahe, dass *ball* eine Funktion in der Zellproliferation besitzt. Ein experimentelles System zur Untersuchung verschiedener Aspekte der Zellteilung und Proliferation in Larven und Adulten bietet die Keimzellentwicklung der Männchen (siehe 1.2 und 1.4). Ein Fokus der Analysen während der Spermatogenese schien auch deshalb sinnvoll, weil beide mutanten *ball*-Allele zur Untersuchung der Spermatogenese genutzt werden können und die Defekte in den männlichen Larven und adulten Tieren vergleichsweise einfach zu detektieren sind.

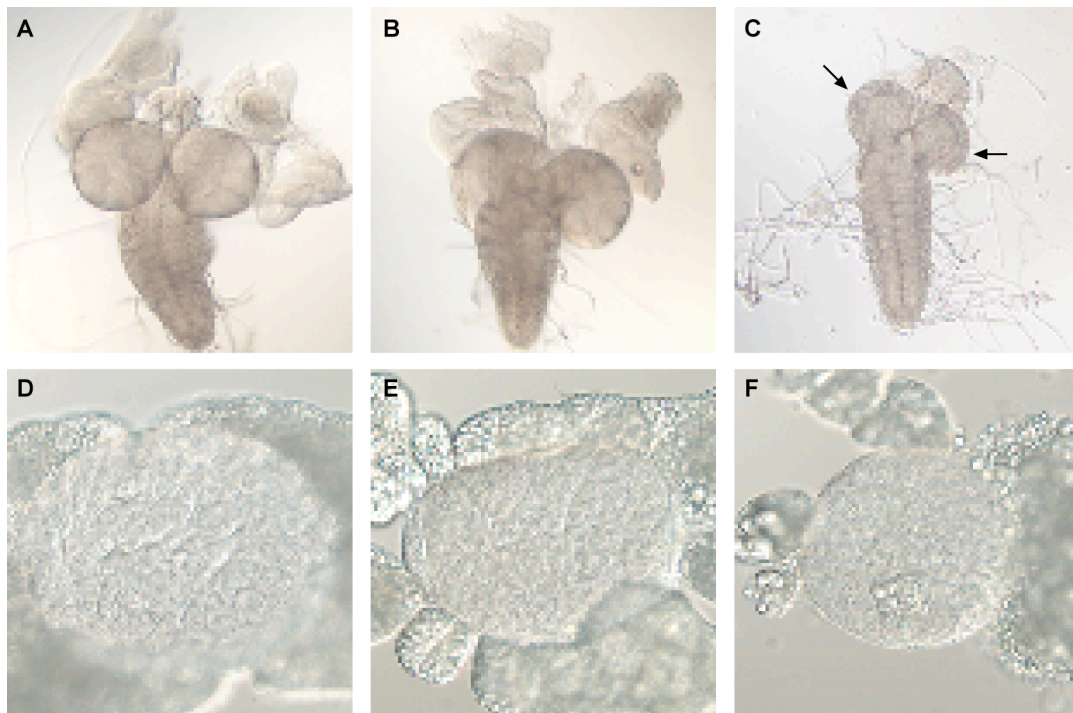


Abb. 2.9: Lichtmikroskopische Aufnahmen unfixierter Gewebe aus *ball*-Larven (spätes drittes Larvenstadium).

(A-C): Die Gehirne und Imaginalscheiben der Augen sind in homozygoten *ball*¹-Larven (B) im Vergleich zur Kontrolllarve (*ball*^{rev}, homozygot, A) nicht reduziert. Die Gehirne homozygoter *ball*²-Larven (C) dagegen sind deutlich verkleinert, besonders betroffen sind die optischen Loben (Pfeil). Imaginalscheiben sind in homozygoten mutanten *ball*²-Larven nicht vorhanden, Aufnahmen bei gleicher Vergrößerung. (D-F): Gonaden der Männchen bei gleicher Vergrößerung: homozygote *ball*¹-Gonaden (E) sind kleiner als die balanzierten *ball*²-Kontrollgonaden (D). Dieser Phänotyp ist bei homozygot mutanten *ball*²-Larven (F) noch verstärkt.

2.6 Phänotypische Untersuchungen der Keimzellentwicklung in *bällchen*-Mutanten

2.6.1 *bällchen*-Aktivität ist für die Keimzellentwicklung von Männchen und Weibchen notwendig

Die reduzierte Größe der larvalen *ball*-Testes ist, wie in Abbildung 2.10 A-D gezeigt, mit einer Reduzierung der Anzahl an Keimzellen verbunden. Dieser Phänotyp ist in Gonaden des amorphen *ball*²-Allels stärker ausgeprägt als im hypomorphen Allel *ball*¹ (Vergleich Abb. 2.10 B und D). Kreuzungen von *ball*² mit einer Defizienzlinie (siehe 4.4.4; 2.4.4) zeigten keine Verstärkung dieses Gonadenphänotyps (Vergleich Abb. 2.10 C und D). In beiden Fällen variiert die Ausprägung des Gonadenphänotyps, das heißt, außer Gonaden mit reduzierter Keimzellzahl wurden auch kleinere Testes mit einzelnen

Keimzellen gefunden. Betrachtet man die Defizienzlinie als Nullallel von *ball*, wird der amorphe Charakter von *ball*² (siehe 2.4.4) auch für die männliche Keimzellentwicklung nochmals bestätigt, der Phänotyp wird also nicht verstärkt.

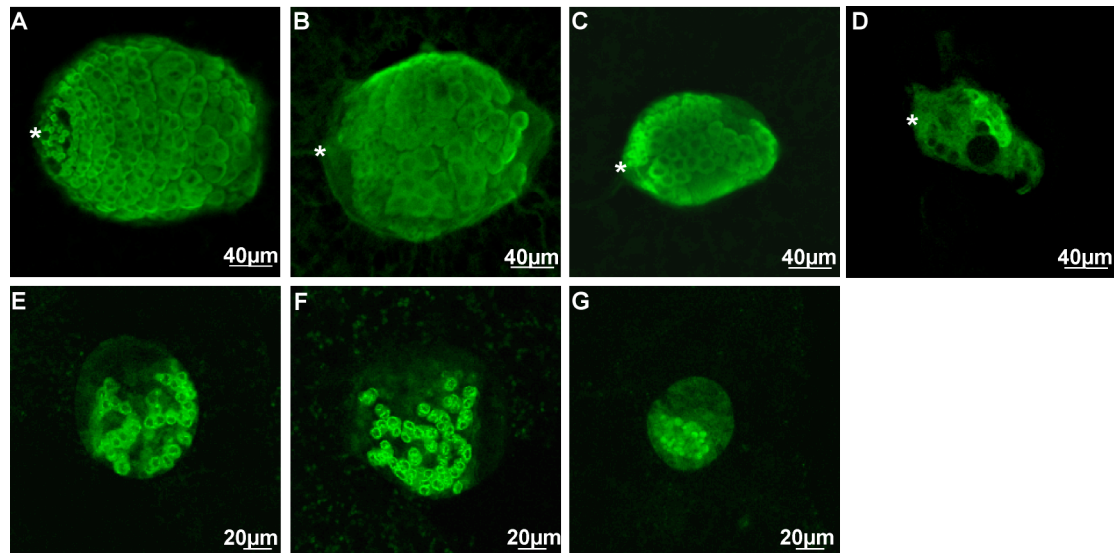


Abb. 2.10: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Gonaden von späten dritten Larven.

(A-C): Anti-Vasa-Antikörperfärbung (grün) an männlichen Gonaden von homozygoten *ball*^{ev}-Kontrollgonaden (A), homozygot mutanten *ball*¹-Larven (B), mutanten *ball*²/Defizienz-Larven (C) und homozygot mutanten *ball*²-Larven (D). Der Stern markiert die Testisspitze (E-G): weibliche Gonaden unfixiert. Die Keimzellen exprimieren ein *vasa::GFP* Reportergen (grün). Kontrollgonade einer homozygoten *ball*^{ev}-Kontrolllarve (E), homozygote mutante *ball*¹-Gonade (F), homozygot mutante *ball*²-Gonade (G).

Während bei den Männchen die Keimzellproliferation und Differenzierung, wie in der Einleitung beschrieben, schon während der Larvenentwicklung beginnt und die Gonaden daher bereits groß und gefüllt mit frühen Spermatogenesestadien (Spradling, 1993) sind, beginnt die differenzielle Entwicklung der weiblichen Keimbahn erst während der Puppenentwicklung (King, 1970; Spradling, 1993). Während der Larvenstadien kommt es lediglich zu mitotischen Teilungen der PKZ (King, 1970; Zhu und Xie, 2003), so dass am Ende der Larvenentwicklung ca. 90 primäre Keimzellen pro Gonade enthalten sind (Kai und Spradling, 2004). In Abbildung 2.10 E-G sind weibliche Larvengonaden gezeigt, deren Keimzellen ein *vasaGFP*-Reportergen exprimieren (siehe 4.4.8). Wie in Abbildung 2.10 E zu sehen, enthalten die weiblichen Wildtyp-Gonaden weniger Keimzellen als die männlichen Gonaden. Abbildung 2.10 F zeigt, dass die weibliche Keimzellentwicklung in homozygoten *ball*¹-Individuen nicht

betroffen zu sein scheint. Auch die folgende Oogenese muß zumindest teilweise normal verlaufen, da adulte *ball*¹-Weibchen fertil sind.

Dagegen ist die weibliche Keimzellentwicklung, wie in Abbildung 2.10 G gezeigt, durch das Allel *ball*² sichtbar betroffen, das heißt, die verkleinerten *ball*²-Gonaden enthalten weniger PKZ. Die in Abbildung 2.10 E-G abgebildeten Keimzellen exprimieren ein VasaGFP-Reporterprotein (siehe 4.4.4). Vasa ist in Keimzellen cytoplasmatisch lokalisiert (Hay et al., 1988a, 1988b; Van Doren et al., 1998). In *ball*²-Mutanten ist die Lokalisation weniger eindeutig als in den Keimzellen der Kontrolle (*ball*^{rev}; Abb. 2.10 E). Eine deutliche Aussparung des großen Nukleus, wie in *ball*^{rev}- und *ball*¹-Individuen zu sehen, ist in *ball*²-Mutanten nicht zu beobachten.

Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass auch beim mutanten Allel *ball*¹ die weibliche Keimzellentwicklung nicht detektierbar betroffen und die Fertilität der Weibchen eingeschränkt ist, ein Aspekt, der aufgrund des hypomorphen Charakters des Allels nicht weiter verfolgt wurde. Die Analyse der Keimzellentwicklung konzentrierte sich daher auf die Spermatogenese, bei der beide mutanten Allele zur Analyse herangezogen werden konnten.

2.6.2 Die *bällchen*-Proteinexpression während der Entwicklung der Gonaden

Bereits in 2.2 wurde gezeigt, dass *ball*-mRNA während der Entwicklung in den Gonaden beider Geschlechter exprimiert wird. Um die Verteilung des *ball*-Proteins zu untersuchen, wurden polyklonale Antikörper gegen Ball hergestellt (siehe 4.2.15). In Antikörperfärbungen gegen *ball*-Protein konnte die Expression auf Proteinebene bestätigt werden. In Abbildung 2.11 A-F sind Antikörperfärbungen an adulten Testes gezeigt. Ball konnte darin in diversen Stadien der Keimzellentwicklung nachgewiesen werden. Dabei ist die Detektion besonders stark in den frühen Spermatogenesestadien, den Stammzellen, Gonialblasten und Spermatogonien (Abb. 2.11 A-C). In den genannten Spermatogenesestadien lokalisiert Ball innerhalb des Zellkerns, wahrscheinlich in den prominenten Nukleoli (Abb. 2.11 C). Während der primären Spermatozytenreifung wird die Färbung schwächer, Ball bleibt aber nukleär angereichert. Außer der Expression in der Keimbahn detektieren die Antikörper Signale in den Kernen der somatischen Hubzellen (Abb. 2.11 C). Die Expression dort erscheint

aber schwächer als in den umgebenden Keimbahnstammzellen. Eine Kernlokalisierung konnte auch noch in reifen Spermatozyten (Abb. 2.11 D) und in postmeiotischen

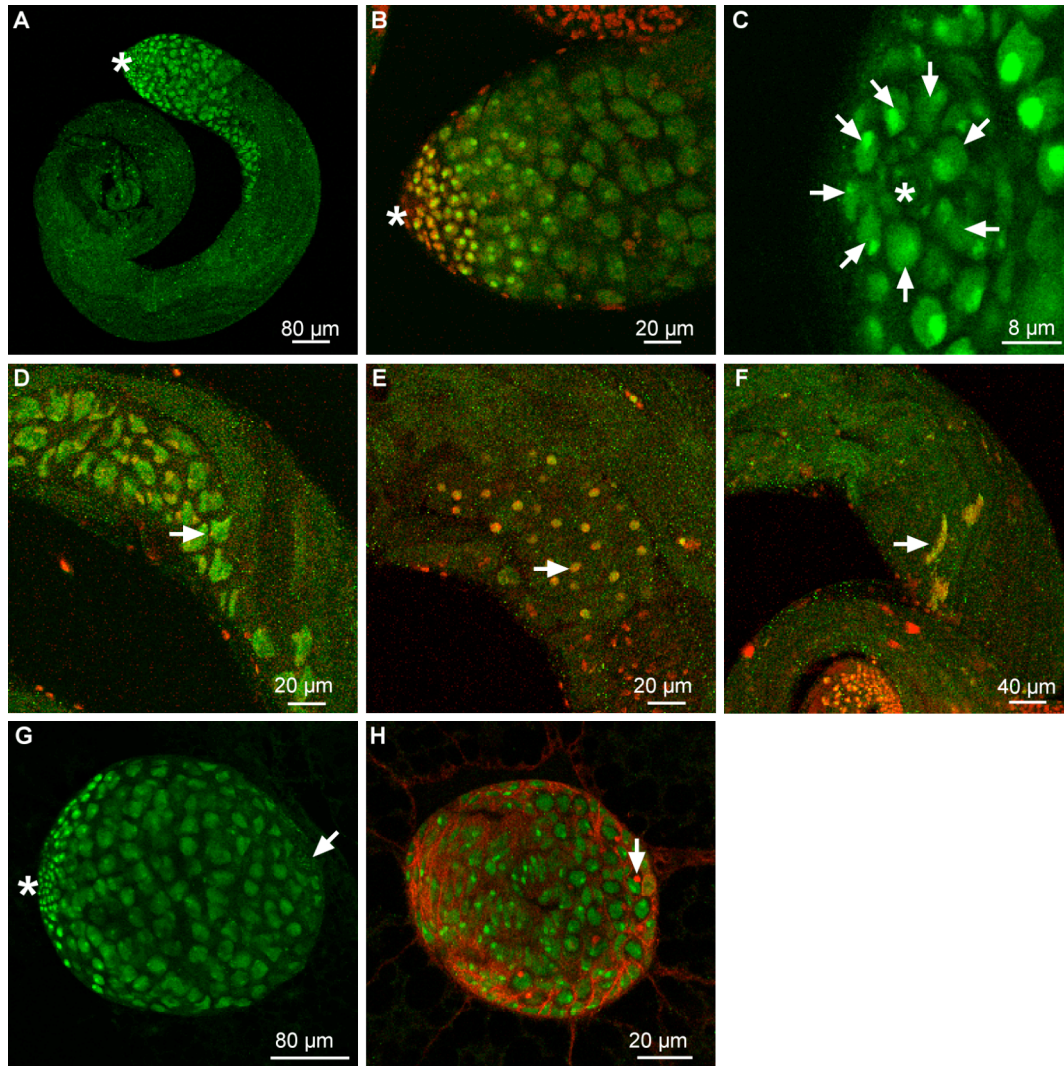


Abb. 2.11: *bällchen*-Proteinexpression in weiblichen und männlichen Gonaden.

Konfokalmikroskopischer Nachweis von *ball*-Protein (anti-Ball, grün), DNA (rot) und Spektrosomen (in H, mAB1B1, rot). (A-F): Testisschlauch eines adulten Wildtyp-Männchens. *ball* wird in den Kernen der Keimzellen in allen Entwicklungsstadien exprimiert (A). In den vergrößerten Darstellungen der Testisspitze (Stern) ist die nukleäre *ball*-Expression in den Keimzellen gezeigt (B,C). Die Keimbahnstammzellen (Pfeile in C) umgeben die somatischen Hubzellen (Stern), *ball* wird in Keimzellen und Hubzellen exprimiert (C), die Keimbahnstammzellen (Pfeile in C) umgeben die somatischen Hubzellen (Stern). *ball*-Expression und Kernlokalisierung in späteren Spermatogenesestadien in reifen primären Spermatozyten (D), in postmeiotischen Spermatiden (E) und in den Köpfen elongierter Spermien (F). (G): männliche Wildtyp-Gonade im späten dritten Larvenstadium. Nachweis der *ball*-Expression in den Kernen der Keimzellen und schwach in somatischen Terminalzellen (Pfeil). (H): weibliche Wildtyp-Gonade im späten dritten Larvenstadium. Nachweis der *ball*-Expression in den Kernen der primären Keimzellen (enthalten Spektrosome, Pfeil) und in den somatischen Zellkernen der Gonade.

Spermatiden (Abb. 2.11 E) nachgewiesen werden. Ferner detektieren die Antikörper Ball schwach in den stark kondensierten Köpfen der ausdifferenzierten Spermatiden

(Abb. 2.11 F). Die Spezifität der Antikörper wurde dadurch getestet, dass die Antikörperfärbung mit einem weiteren gegen Ball gerichteten Antikörpern wiederholt wurde (anti-NHK; Aihara et al., 2004). Die Antikörper wiesen in beiden Fällen das gleiche Expressionsmuster im Testis nach, was die Spezifität der anti-Ball-Antikörper bestätigt.

In den larvalen männlichen Gonaden zeigt Ball ebenfalls eine nukleäre Lokalisation in den Keimzellen und in den somatischen Hub- und Terminalzellen (Abb. 2.11 G). In den weiblichen larvalen Gonaden kann Ball sowohl in somatischen Nuklei als auch in den durch Spektrosome gekennzeichneten primären Keimzellen nachgewiesen werden (Abb. 2.11 H).

2.6.3 Untersuchungen der somatischen Gonadenkomponenten

In 2.6.2 ist gezeigt, dass *ball* nicht nur in den Keimzellen exprimiert wird, sondern auch in den somatischen Hubzellen der Gonade nachgewiesen werden kann. Wie in der Einleitung unter 1.4 beschrieben besteht ein enger regulatorischer Kontakt zwischen somatischen Gonadenzellen und Keimbahn. Die Hubzellen an der Testisspitze und die Zystzellen, beides somatische Zelltypen, sind essentiell an der Bildung und Differenzierung der Keimbahn beteiligt. Die Hubzellen bilden die Stammzellnische für die Keimbahn (Übersichtsartikel: Gilboah und Lehmann, 2004; Yamashita et al., 2005; siehe auch 1.4). Sie sind über Signalwege an der Regulation des Erhalts der Stammzellen und an den asymmetrischen Stammzellteilungen beteiligt. Störungen dieser Signalwege können zum Verlust der Keimbahnstammzellen führen (siehe 1.2 und 1.4). Die Zystzellen gehen aus somatischen Stammzellen hervor, die sich in Nähe des Hubs befinden (siehe 1.2 und 1.4). Je zwei Zystzellen umgeben den Gonialblasten und die sich daraus entwickelnden Spermatozyten. Die Zystzellen spielen eine wichtige Rolle bei den mitotischen Teilungen und nachfolgenden Differenzierungen der Keimzellen (siehe 1.3 und 1.4).

Um zu sehen, ob somatische Gonadenbereiche in mutanten *ball*-Allelen betroffen sind, wurden die Hubzellen und Zystzellen, welche die Keimzellzysten umgeben, über spezifische "Enhancer-Trap-Markergene" (LacZ600, LacZ254; Gönczy et al., 1992) in den *ball*-Allelen nachgewiesen. Diese Markergene enthalten P-Element-Insertionen, bei

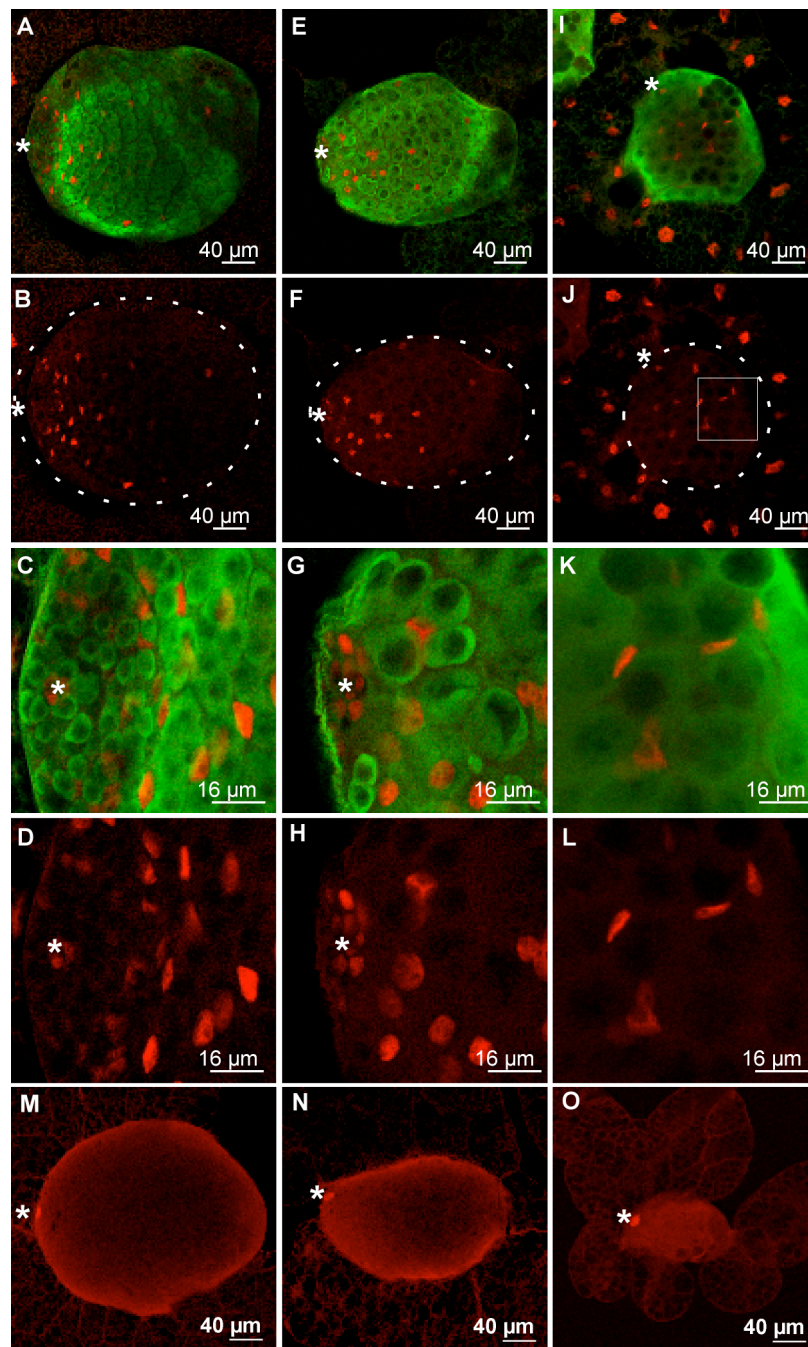


Abb. 2.12: Konfokale Aufnahmen der somatischen Zystzellen und Hubzellen in spät-larvalen bällchen-Testes. Antikörperfärbung der Keimzellen (anti-Vasa, grün), und Nachweis der β -Gal-Expression (anti-LacZ, rot) der Enhancer-Trap-Linien LacZ600 (β -Gal-Expression in den Hubzellen und Zystzellen, A-L) und LacZ254 (β -Gal-Expression stark angereichert in den Hubzellen, M-O). (A-D): balancierte *ball²*-Kontrollgonade. β -Gal-Expression in den Hubzellen (Stern) und Zystzellen, die Zystzellen umgeben die Keimzellzysten, Darstellung der ganzen Gonade (A,B), vergrößerte Darstellung des Tipbereichs (C,D). (E-H): Die β -Gal-Expression in homozygot mutanten *ball¹*-Larven markiert die Hubzellen (Stern) und wenige Zystzellen. Darstellung der ganzen Gonade (E,F), vergrößerte Darstellung des Tipbereichs (G,H). (I-L): Die β -Gal-Expression in homozygot mutanten *ball²*-Larven zeigt wenige Zystzellen. Hubzellen können nicht identifiziert werden. Darstellung der ganzen Gonade (I,J), die vergrößerte Darstellung der in J markierten Fläche (K,L) zeigt Zystzellen, welche Keimzellzysten zu umgeben scheinen. (M-O): Nachweis der β -Gal-Expression von LacZ254 in den Hubzellen in homozygoter *ball^{rev}*-Kontrollgonade (M), homozygot mutanter *ball¹*-Gonade (N) und homozygot mutanter *ball²*-Gonade (O).

denen ein *lacZ*-Reportergen mit einem schwachen, endogenen Promotor fusioniert ist (Bellen et al., 1989; Bier et al., 1989). Die P-Elemente sind an Orten im Genom integriert, wo diese Promotoren unter dem Einfluss benachbarter Enhancer zu einer spezifischen Expression des Reportergens führen.

Die hier verwendeten Enhancer-Trap-Linien LacZ600 und LacZ254 exprimieren β -Gal, wie im Folgenden gezeigt, in verschiedenen somatischen Zelltypen im Testis (Gönczy et al., 1992). Sie wurden durch Kreuzen in das Genom der *ball*-Allele eingebracht (siehe 4.4.8). Die β -Gal-Expression wurde durch Antikörperfärbung (Anti-LacZ; siehe 4.3.5) in larvalen Testes nachgewiesen. Wie in Abbildung 2.12 A-D gezeigt, exprimiert die Enhancer-Trap-Linie LacZ600 β -Gal in den Zellen des Hubs und in den Zystzellen. Hub- und Zystzellen sind in mutanten *ball*¹-Individuen ebenfalls enthalten (Abb. 2.12 E-H). Die Anzahl der Zystzellen ist aber reduziert. In homozygot mutanten *ball*²-Individuen sind ebenfalls einige Zystzellen vorhanden, welche Keimzellzysten zu umgeben scheinen (Abb. 2.12 I-L).

Hubzellen konnten in homozygot mutanten *ball*²-Larven mithilfe dieser Markerlinie nicht eindeutig identifiziert werden. Der Nachweis gelang aber unter Verwendung einer anderen Enhancer-Trap-Linie (LacZ254) (Abb. 2.12 M-O). Diese Linie exprimiert, wie in Abbildung 2.12 M zu sehen, β -Gal hochangereichert in den Hubzellen der homozygoten *ball*^{rev}-Kontrollgonade (Abb. 2.12 M). Beide mutanten *ball*-Allele zeigen eine *lacZ*-Expression in den Hubzellen der larvalen Gonaden (Abb. 2.12 N,O).

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass wesentliche Elemente der somatischen Gonade – die Hubzellen und die Zystzelllinie – in den Gonaden der mutanten *ball*-Männchen angelegt sind. Es ist bekannt, dass dieser Vorgang unabhängig von der Keimbahn stattfindet (Gönczy und DiNardo, 1996; Übersichtsartikel: Fuller, 1993). Die Keimzellen nehmen erst im Verlauf der Spermatogenese Einfluss auf das Soma (Gönczy und DiNardo, 1996). Die Reduktion der Zystzellzahl in homozygot mutanten *ball*²-Larven könnte damit ein Ergebnis der reduzierten Keimzellzahl sein.

2.6.4 *bällchen* wird zum Überleben der Keimzellen benötigt

In *ball*²-Mutanten ist in den männlichen Gonaden eine unterschiedlich stark reduzierte Anzahl an Keimzellen zu finden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die

Keimzellen degenerieren. Diese Möglichkeit wurde mit Antikörperfärbungen untersucht. Die verwendeten Antikörper detektieren in *Drosophila* die aktivierte Form der Effektor-Caspase Drice (Yu et al., 2002; siehe 4.3.5).

Dabei handelt es sich um ein Mitglied der Effektor-Caspasen, die durch verschiedene Signalwege aktiviert werden können in ihrer aktivierten Form den programmierten Zelltod durch Proteolyse von intrazellulären Proteinen einleiten. (Übersichtsartikel: Meier et al., 2000). Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.13 gezeigt.

In den Antikörperfärbungen konnten vereinzelt Apoptosesignale in frühen Keimzellstadien der *ball^{rev}*-Kontrollgonaden (Abb. 2.13 A,B) nachgewiesen werden. Ein ähnliches Bild zeigten die Gonaden des hypomorphen Allels. In mutanten *ball¹*-Männchen konnte keine deutliche Zunahme von apoptotischen Zellen beobachtet werden (Abb. 2.13 C,D). Die Gonaden des mutanten *ball²*-Allels lieferten dagegen deutlich mehr Apoptosesignale als die Kontrollgonaden (Abb. 2.13 E,F). *ball* scheint damit für das Überleben der männlichen Keimzellen benötigt zu werden. Dies gilt zumindest für das Nullallel *ball²*. Aber auch wenn für *ball¹* keine vermehrte Apoptose beobachtet werden konnte, kann ein entsprechender Effekt hier nicht ausgeschlossen werden.

Neben der Möglichkeit, dass es sich bei der Apoptose in den mutanten Keimzellen des *ball²*-Allels um einen Sekundäreffekt handelt, ist eine direkte Rolle von *ball* bei der Regulierung der Apoptose in der Keimbahn denkbar. Tatsächlich gibt es Hinweise auf eine solche Funktion von *ball*. Für das Maushomolog von *ball*, dem Gen, das für die Vaccinia Related Kinase 1 (VRK1) codiert (siehe 2.1), konnte die *in vitro*-Phosphorylierung des proapoptotischen Proteins P53 nachgewiesen werden (Lopez-Borges und Lazo, 2000).

Der *p53* vermittelte Apoptoseweg ist hochkonserviert und auch in *Drosophila* aktiv (Ollmann et al., 2000; Brodsky et al. 2000; Jin et al., 2000). Für das *Drosophila*-Homolog *Dmp53* konnte über *in situ*-Hybridisierung zudem gezeigt werden, dass es – ebenso wie *ball* – in den Keimzellen im Embryo exprimiert wird (Ollmann et al., 2000). Darüber hinaus interagieren Ball und Dmp53 im "Yeast Two Hybrid System" in Hefe (T. Herzig, persönliche Mitteilung). Eine Phosphorylierung von Dmp53 durch Ball könnte, dem Phänotyp entsprechend, einen hemmenden Einfluss auf die proapoptotische Funktion von *Dmp53* haben. *ball* wäre dann ein Negativregulator für

die Apoptose in der Keimbahn. Um diese Möglichkeit zu überprüfen wurden Fliegen untersucht, die gleichzeitig mutant für das lebensfähige Nullallel von *Dmp53* (Rong et al., 2002) und für *ball*² waren (siehe 4.4.12). Für den Fall, dass *ball* als Negativregulator von *Dmp53* wirkt, würde ein Funktionsverlust beider Gene zur Aufhebung der Apoptose in den larvalen Gonaden der Doppelmutanten führen.

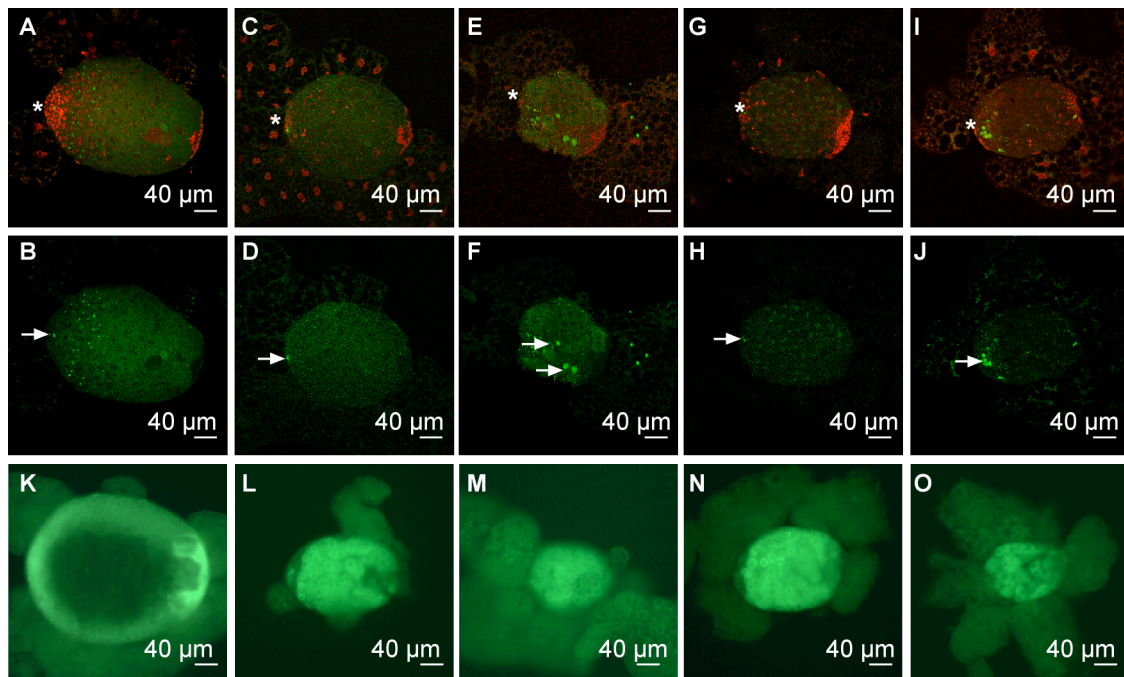


Abb. 2.13: Apoptosenachweis in männlichen spät-larvalen *ball*-Gonaden.

(A-J): Apoptosenachweis (mAb5A1, grün) und DNA-Färbung (rot) in homozygoten *ball*^{rev}-Kontrollgonaden (A,B), homozygot mutanten *ball*¹-Gonaden (C,D), mutanten *ball*²/Defizienz-Gonaden (E,F), Gonade der homozygoten Doppelmutante *p53*^{A-1-4}, *ball*¹ (G,H), Gonade der homozygoten Doppelmutante *p53*^{A-1-4}, *ball*² (I,J), die Sterne markieren die Testisspitze, die Pfeile markieren Apoptosesignale, Konfokalmikroskopie. (K-O): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von unfixierten männlichen larvalen Gonaden, Nachweis der *vasaGFP*-Expression (grün) in den Keimzellen der balancierten Doppelmutante *p53*^{A-1-4}, *ball*¹ (K), homozygot mutante *ball*¹-Gonade (L), homozygot mutante *ball*²-Gonade (M), Gonade einer homozygoten *p53*^{A-1-4}, *ball*¹-Doppelmutante (N), Gonade einer homozygoten *p53*^{A-1-4}, *ball*²-Doppelmutante (O).

In Abbildung 2.13 G-J sind die Ergebnisse der Doppelmutantenanalyse gezeigt. In den Gonaden der Doppelmutanten konnte keine Abnahme der Apoptosesignale im Vergleich zu den mutanten *ball*-Allelen beobachtet werden (Abb. 2.13 G-J). Auch hinsichtlich der Größe und dem Keimzellgehalt der Gonaden unterschieden sich die Doppelmutanten nicht von den entsprechenden mutanten *ball*-Allelen (Abb. 2.13 K-O). Der unveränderte Phänotyp der Doppelmutanten zeigt, dass die Funktion von *ball* nicht

in einem direkten Zusammenhang mit einer proapoptotischen Funktion von *Dmp53* in den Keimzellen gebracht werden kann.

2.6.5 *bällchen* wird in der männlichen Keimbahn für die Proliferation der Keimzellen benötigt

Bereits in den larvalen Testes kommt es zur kontinuierlichen Produktion von Keimzellen (siehe 1.2 und 1.3). 16-18 Keimbahnstammzellen sind in der späten larvalen Gonade um die somatischen Hubzellen herum gruppiert (Übersichtsartikel: Fuller, 1993). Ihre Tochterzellen, die Gonialblasten, liegen etwas abseits von der Gonadenspitze, gefolgt von den entwickelnden Spermatozyten. Die vier unvollständigen mitotischen Teilungen innerhalb der Zyste verlaufen sehr schnell, so dass sich der größte Teil der Keimzellen in der Gonade als 16-Zell-Zysten im primären Spermatozytenstadium befindet. In diesem Stadium befinden sich die Keimzellen am Beginn der Meiose. Die larvalen primären Spermatozyten arretieren dann in der G2-Phase der Meiose I bis zum Erreichen des Puppenstadiums (Fuller, 1993).

Um zu sehen, ob die kontinuierliche Keimzellproduktion und die Zystproliferation in den larvalen *ball*-Testes gestört ist, wurde die Keimzellentwicklung in Antikörperfärbungen gegen Zelltyp-spezifische Marker untersucht. Die Hubzellen exprimieren den Hubzellmarker Fasciclin III (Brower et al., 1981; siehe 4.3.5), der mit den Antikörpern mAb7G10 detektiert wird. Die Spektrosome bzw. Fusome enthalten das zytoskeletale Protein Hu-li tai shao (Hts; Lin et al., 1994; siehe 4.3.5), dessen Detektion mit den Antikörpern mAb1B1 erfolgte. Die Keimzellen wurden mit anti-Vasa-Antikörpern nachgewiesen (Hay et al., 1988a; 1988b; siehe 4.3.5). Das Entwicklungsstadium der Keimzellen konnte durch ihre Lage zum Hub, die Größe der Zellen und Kerne sowie die Struktur der enthaltenen Fusome bestimmt werden (siehe 1.3).

Wie in Abbildung 2.14 A gezeigt sind die Gonaden der *ball^{rev}*-Kontrollindividuen zum größten Teil mit primären Spermatozyten gefüllt. Die Struktur der Fusome wird von der Gonadenspitze fort zunehmend verzweigt und unregelmäßig (Abb. 2.14 B). Die punktförmigen Spektrosome sind nur in den Keimbahnstammzellen und Gonialblasten in der Gonadenspitze zu finden (Abb. 2.14 C,D). Die Anzahl der Keimzellen pro Zyste

konnte durch die Lage der Keimzellen zueinander bestimmt werden. Da so nur Keimzellen gezählt wurden, die in einer Fokusebene lagen, kann die tatsächliche Zahl der Keimzellen pro Zyste über der ermittelten liegen. Auf diese Weise konnten, wie in Abbildung 2.14 zu sehen, in den Kontrollgonaden des Wildtyppallels für *ball^{rev}* Zysten mit mindestens acht Keimzellen identifiziert werden. In Gonaden des hypomorphen homozygoten *ball¹*-Allels waren ebenfalls vor allem Keimzellzysten sichtbar, deren Keimzellen sich aufgrund der Größe ihres Kerns vermutlich in der prämeiotischen Wachstumsphase der primären Spermatozytenentwicklung befanden (Abb. 2.14 F,G). Ein weiterer Hinweis auf die bereits fortgeschrittene Differenzierung lieferte die Struktur der Fusome in den Gonaden im mutanten *ball¹*-Allel. Diese ähnelt der unregelmäßigen Fusomstruktur von späten Spermatogenesestadien im basalen Bereich der Kontrollgonade (vergleiche Abb. 2.14 B und G). Von der Reduktion der Keimzellzahl in den Gonaden des mutanten *ball¹*-Allels scheinen insbesondere die frühen Spermatogenesestadien betroffen zu sein: Wie in Abbildung 2.14 H und I gezeigt, sind vergleichsweise wenige Keimzellen in unmittelbarer Nähe zum Hub vorhanden. Da sie Spektrosome besitzen, könnte es sich bei den kleinkernigen Zellen um Stammzellen und/oder Gonialblasten handeln. Hinsichtlich der Zystproliferation konnten auch für dieses Allel Zysten mit mindestens acht Keimzellen gezählt werden (Abb. 2.14 J).

Die Analyse des amorphen Alles *ball²* erfolgte an Larven, die eine Kopie der *ball²*-Mutation und eine Kopie einer genomischen Defizienz in der Region 97D, die als Nullallel von *ball* dient, enthielten (siehe 2.4.4 und 2.6.1). Gonaden dieses Nullalls von *ball* zeigten eine Verstärkung des für *ball¹* beschriebenen Phänotyps. Die Zahl der Keimzellen ist in diesen Mutanten noch stärker als im hypomorphen *ball¹*-Allel reduziert. Der Morphologie und Fusomstruktur nach scheinen die meisten Keimzellen auch hier mit der Differenzierung begonnen zu haben (Abb. 2.14 K,L). In Hubnähe konnten nur vereinzelt Keimzellen nachgewiesen werden (Abb. 2.14 M,N). Die Größe der Kerne spricht dafür, dass es sich hierbei nicht um Stammzellen oder Gonialblasten handelt, sondern ebenfalls um Keimzellen, die bereits mit der Differenzierung begonnen haben. Auch im mutanten *ball²*-Allel enthielten die Gonaden Zysten mit mindestens acht Keimzellen (Abb. 2.14 O). Die Keimzellen einer Zyste besaßen in beiden mutanten *ball*-Allelen gleichmäßig große Kerne, was auf einen ungestörten Ablauf der primären

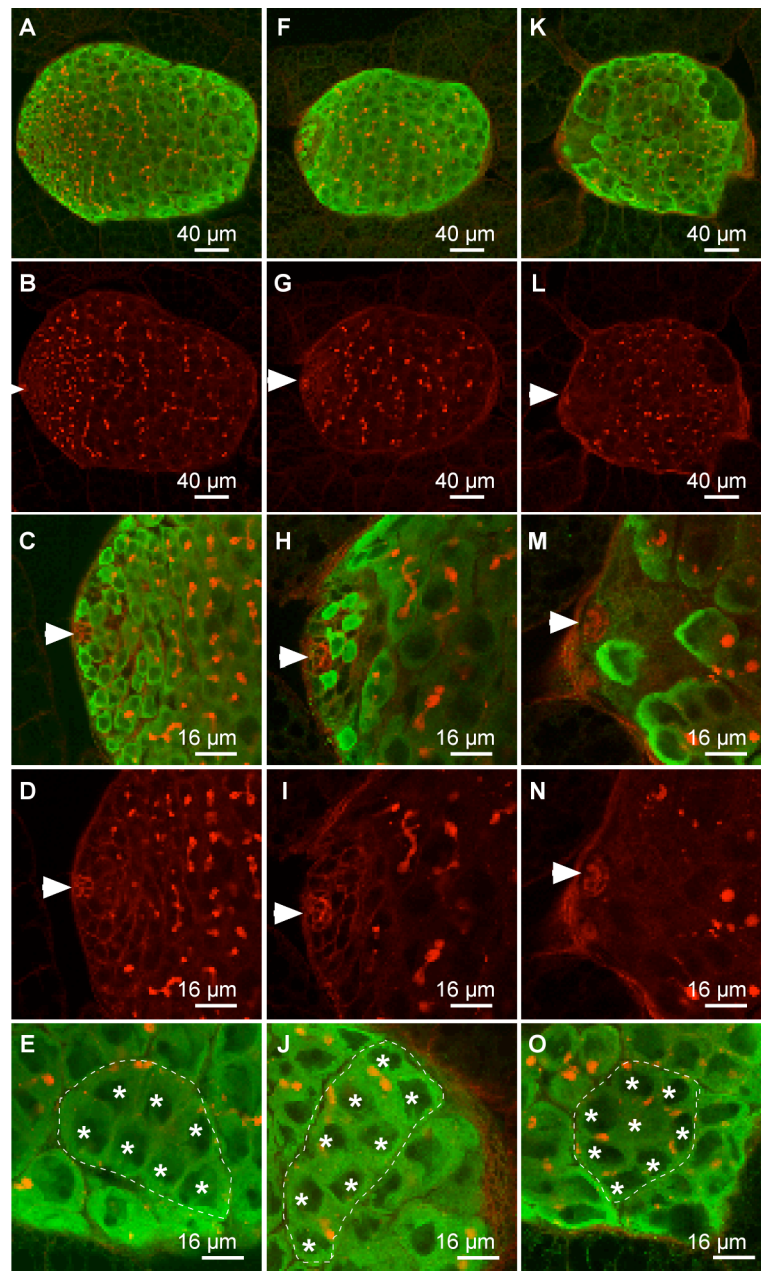


Abb. 2.14: Darstellung der Proliferationsdefekte in männlichen *ball*-Gonaden in späten dritten Larven.

Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Antikörperfärbungen der Keimzellen (anti-Vasa, grün), der Hubzellen (mAb7G10, rot, Pfeile) und der Spektrosome bzw. Fusome (mAb1B1, rot). **(A-E):** Die homozygote *ball^{rev}*-Kontrollgonade ist gefüllt mit fusomhaltigen Keimzellzysten (A,B). In der Vergrößerung der Gonadenspitze ist die Anordnung der kleineren Keimbahnstammzellen um die Hubzellen herum gezeigt (C), diese Stammzellen enthalten punktförmige Spektrosome (D). Im terminalen Gonadenbereich liegen Keimzellzysten mit mindestens acht Keimzellen (Sterne), nur sieben sind im Bild sichtbar (E). **(F-J):** Die homozygot mutante *ball¹*-Gonade enthält weniger Keimzellen (F), diese besitzen verzweigte Fusome (G). Die Vergrößerung der Gonadenspitze zeigt wenige Keimzellen in Nähe der Hubzellen (H), welche Spektrosome enthalten (I). Im terminalen Bereich befinden sich Keimzellzysten mit mindestens acht Keimzellen (Sterne in J). **(K-O):** In der Gonade der Mutante *ball²/Defizienz* ist die Keimzellzahl noch stärker reduziert (K). Die Keimzellen besitzen Fusome (L). In der Testisspitze befinden sich nur vereinzelt Keimzellen in Hubnähe (M). Die Zahl der Spektrosome ist ebenfalls stark reduziert (N). Die terminal gelegene Keimzellzyste enthält mindestens acht Keimzellen (Sterne in O).

Spermatozytenreifung hinweist. Die Ergebnisse zeigen also, dass die Proliferation der Gonialblasten und der Eintritt in die Differenzierungsphase in den männlichen Gonaden von *ball*-Mutanten prinzipiell möglich zu sein scheint.

Der Verlust an Keimbahnstammzellen in den *ball*-mutanten Allelen wird auch durch DNA-Färbungen, wie in Abbildung 2.15 zu sehen, deutlich. In larvalen Kontrollgonaden des *ball^{rev}*-Allels (Abb. 2.15 A) ergibt die DNA-Färbung ein klares Signal in den Kernen der Zellen früher Spermatogenesestadien, die in Hubnähe liegen. Die Kernfärbung nimmt mit der Größenzunahme der primären Spermatozytenkerne ab.

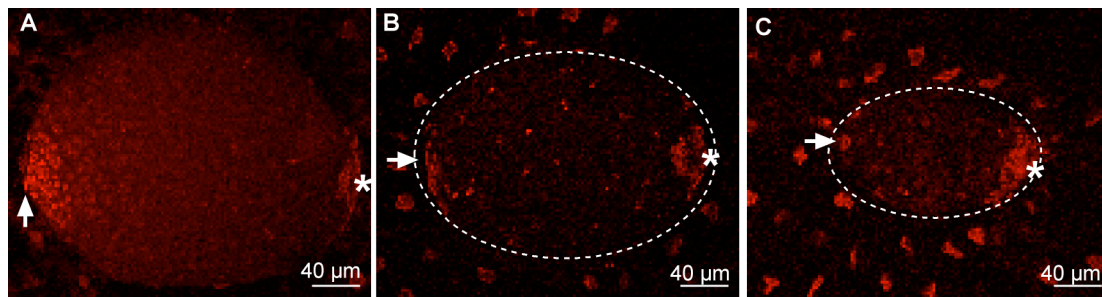


Abb. 2.15: DNA-Färbung an späten larvalen *ball*- Gonaden.

(A): Die DNA-Färbung markiert die kleinkernigen frühen Keimzellstadien (in Hubnähe, Pfeil) und Kerne der somatischen Terminalzellen im männlichen Wildtypallel *ball^{rev}*. (B): homozygot mutante *ball¹*-Gonade, in Hubnähe (Pfeil) sind einige Zellkerne gefärbt, bei denen es sich um Keimzellen handeln könnte. Die Terminalzellen (Stern) sind vorhanden. (C): In homozygot mutanten *ball²*-Gonaden sind keine frühen Keimzellstadien in Nähe der Hubzellen (Pfeil) zu finden. Die Terminalzellen (Stern) sind vorhanden.

Im terminalen Bereich der Gonade sind Kerne somatischer Zellen sichtbar. Diese Terminalepithelzellen (Übersichtsartikel: Fuller, 1993) sind auch in *ball*-mutanten Gonaden vorhanden (Abb. 2.15 B,C). In der gegenüber gelegenen Testisspitze befinden sich in beiden *ball*-Mutanten einige Zellkerne, die in ihrer Anordnung den somatischen Hubzellen ähneln, während im gesamten Bereich der Testisspitze nur wenige Kerne in *ball¹*-Mutanten nachweisbar sind. Hierbei könnte es sich um frühe Keimzellstadien oder Kerne somatischer Zystzellen (siehe 1.2 und 2.6.3) handeln.

2.6.6 Die Keimzellen differenzieren in *ball¹*

In 2.6.5 wurde beschrieben, dass die larvalen Keimzellen beider mutanten *ball*-Allele die frühen Spermatogeneseabläufe wie Mitose, Zystbildung und Spermatozytenreifung

durchlaufen können. Einen weiteren Hinweis auf die Fähigkeit zur Differenzierung liefert das hypomorphe Allel *ball*^l. Die Verwendung dieses Allels, das die Lebensfähigkeit der Tiere nicht beeinträchtigt, erlaubt die Untersuchung der Spermatogenese in adulten Tieren. Dort werden die Keimzellen in der Testisspitze durch kontinuierliches Teilen der Keimbahnstammzellen gebildet, so dass von den Stammzellen in der Testisspitze bis zu den elongierten Spermien im basalen Testisbereich alle Entwicklungsstadien parallel untersucht werden können (siehe 1.2 und 1.3).

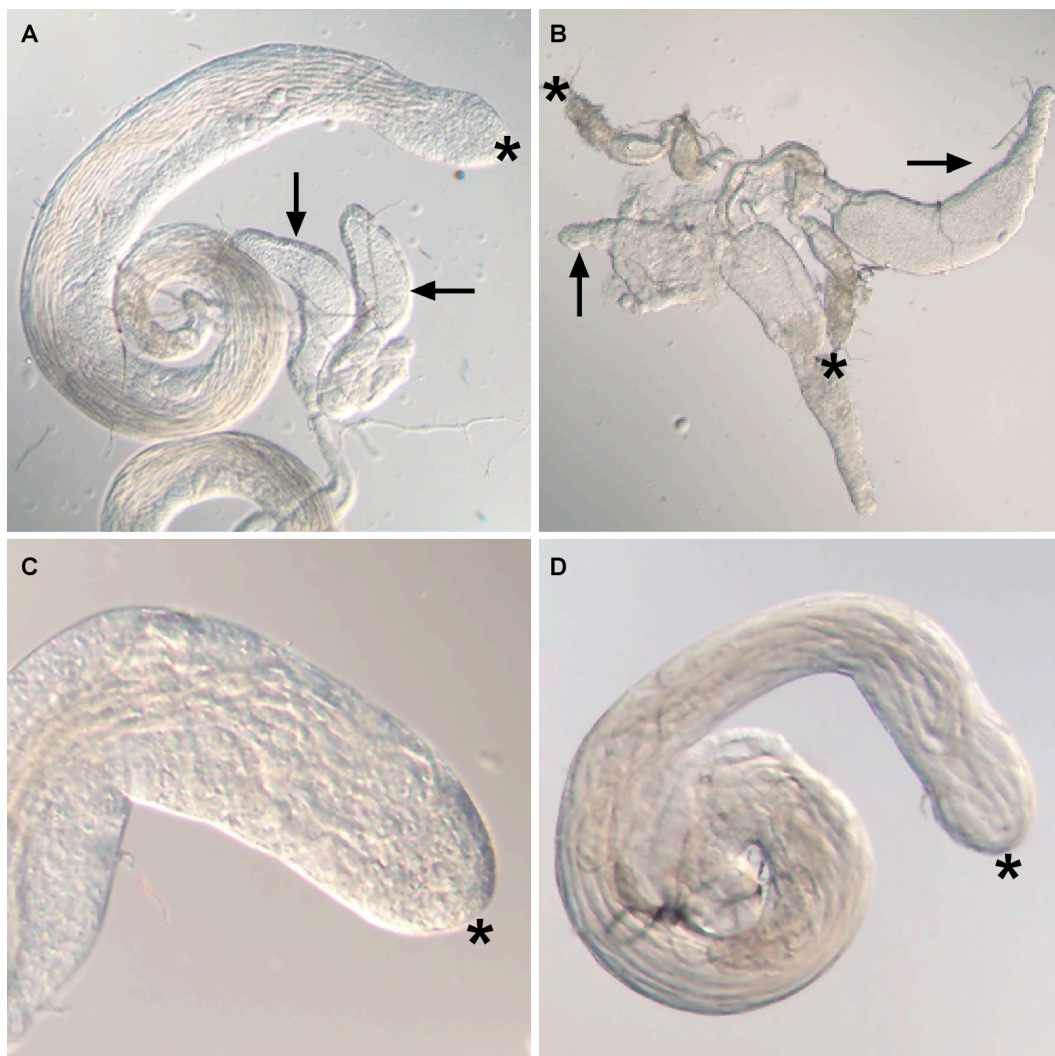


Abb. 2.16: unfixierte Gonadenpräparationen von frisch geschlüpften männlichen adulten Tieren (0-3 h alt). (A,B): männliche Gonaden des Kontrollallels *ball*^{rev} (A) und homozygot mutantern *ball*^l-Allel (B) bei gleicher Vergrößerung. Die Testisspitzen sind mit einem Stern markiert. Von der Kontrollgonade (A) ist nur ein Testisschlauch mit den somatischen Anhangsdrüsen (Pfeile) abgebildet. (C): Die Testisspitze einer *ball*^{rev}-Kontrollgonade ist gefüllt mit frühen runden Keimzellstadien. (D): Reduzierter Testisschlauch einer homozygot mutanten *ball*^l-Gonade in gleicher Vergrößerung wie C, elongierte Spermien sind hier auch in der Spitze zu finden.

Gonadenpräparationen von frisch geschlüpften adulten Männchen (maximal 3 h alt) zeigen in Abbildung 2.16 A und B, dass die adulten homozygot mutanten *ball*¹-Gonaden kleiner sind als Wildtypgonaden. Die somatischen Teile der Gonade, die Anhangsdrüsen und Ausführungsgänge, sind auch in *ball*¹-Mutanten vorhanden. Die Testisschläuche dagegen sind in unterschiedlichem Ausmaß reduziert. Wie in Abbildung 2.16 C und D gezeigt, können in den weniger degenerierten homozygoten *ball*¹-mutanten Testes elongierte Spermien enthalten sein. Diese ausdifferenzierten Spermien sind auch im Bereich der Testisspitze zu finden, ein Bereich, der normalerweise mit frühen runden Spermatogenesestadien gefüllt ist. Testisquetschpräparationen (siehe 4.3.4) an homozygoten *ball*¹-mutanten Testes zeigten, dass die elongierten Spermien nicht vereinzeln und unbeweglich bleiben (ohne Abbildung). Damit ist die Fähigkeit zur Differenzierung der Keimzellen zu elongierten Spermien in *ball*¹-Mutanten gegeben, wenngleich deren Unbeweglichkeit und Sterilität auf weitere Störungen in der Entwicklung hinweist.

2.6.7 *bällchen* wird in der männlichen Keimbahn für den Erhalt der Stammzellen benötigt

In 2.6.5 wurde gezeigt, dass es in den männlichen Gonaden von *ball*¹- und *ball*²-Mutanten zur starken Reduktion beziehungsweise zum Verlust der Keimbahnstammzellen kommt. Die Situation im adulten Testis des hypomorphen Allels liefert weitere Hinweise für den sukzessiven Verlust der Keimbahnstammzellen in *ball*-mutanten Männchen. Die Frage, ob in den jungen adulten homozygot mutanten *ball*¹-Testes noch Spermatogenesestadien aus Stammzellteilungen hervorgehen, wurde durch Antikörperfärbungen der Keimzellen und der Fusome beantwortet. Zum Nachweis der Hubzellen wurde die Enhancer-Trap-Insertion LacZ254 ins *ball*-Genom eingekreuzt (Gönczy et al., 1992; siehe 2.6.3 und 4.4.8). Diese Linie exprimiert ein *lacZ*-Reportergen hochangereichert in den Zellen des Hub. Die β -Gal-Aktivität wurde dann in Antikörperfärbungen mit anti-LacZ-Antikörper (siehe 4.3.5) nachgewiesen. Die Ergebnisse der Antikörperfärbungen sind in Abbildung 2.17 dargestellt. Als Kontrolle diente das Wildtypallel *ball*^{rev} (Abb. 2.17 A-D). Der gewundene Testisschlauch der

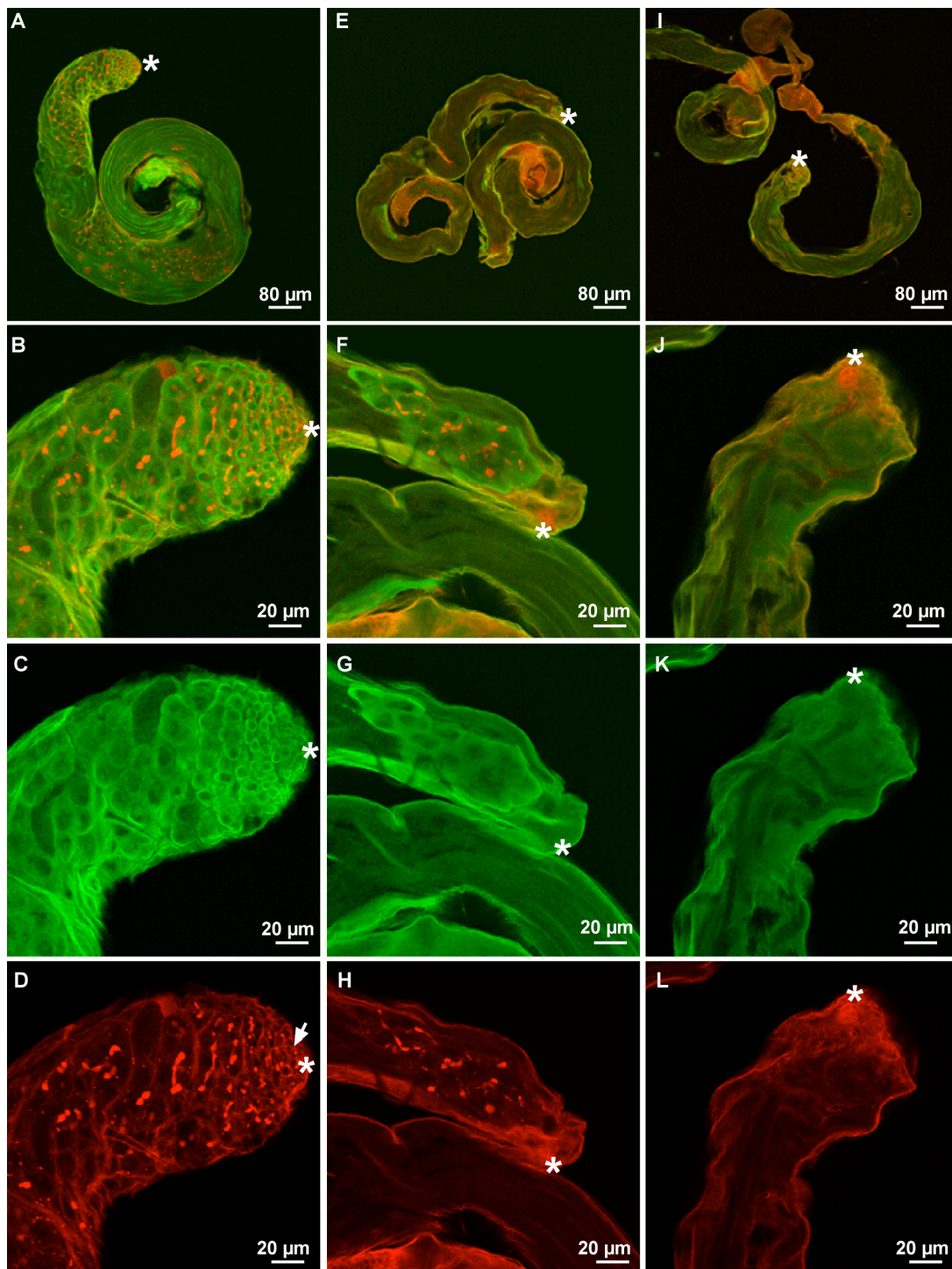


Abb. 2.17: Konfokale Mikroskopieaufnahmen von Testes junger adulter Fliegen (0-3 h alt).

Die Enhancer-Trap-Linie LacZ254 exprimiert β -Gal in den Hubzellen. Antikörperfärbung der Keimzellen (anti-Vasa, grün), der Hubzellen (anti-LacZ, rot) und der Spektrosome bzw. Fusome (mAb1B1, rot). Die Testesspitzen sind mit einem Stern markiert. **(A-D):** balanzierter *ball¹*-Kontrolltestis. Der Testisschlauch (A) ist gefüllt mit runden Vasa-positiven Keimzellen, Fusome sind auch im Testislumen zu finden. In der vergrößerten Darstellung der Testisspitze (B-D) befinden sich die Hubzellen außerhalb der Fokusebene. Die benachbarten Keimzellen enthalten Spektrosome (D, Pfeil). **(E-L):** Die Testesschläuche homozygot mutanter *ball¹*-Individuen sind reduziert (E, I). Die vergrößerte Darstellung der Testisspitze aus E zeigt wenige Keimzellen mit Fusomen in einiger Entfernung zum Hub (Stern, F-H). Die Vergrößerung der Testisspitze aus I zeigt, dass keine runden Spermatogenesestadien im Testis enthalten sind (J-L).

Kontrollgonade enthält Keimzellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien (Abb. 2.17 A). Die Testisspitze ist gefüllt mit frühen Spermatogenesestadien (Abb. 2.17 B-D). Die Hubzellen liegen außerhalb der Fokusebene und sind daher nicht abgebildet. In der Nähe des Hubs liegen Keimbahnstammzellen und Gonialblasten, erkennbar an den Spektrosomen.

In mutanten *ball*¹-Individuen hingegen sind die Testesschläuche reduziert (Abb. 2.17 E-L). Wie in Abbildung 2.17 F-H gezeigt, konnten in den weniger stark degenerierten Testes in wenigen Fällen einige runde Spermatogenesestadien nachgewiesen werden. Diese Keimzellen lagen allerdings nicht in unmittelbarer Nähe zu den Zellen des Hubs. Der Lage und Größe der Kerne nach befanden sich die Keimzellen bereits in der primären Spermatozytenentwicklung (Abb. 2.17 G). Dafür spricht auch die ausgedehnte Struktur der enthaltenen Fusome (Abb. 2.17 H). In den meisten mutanten *ball*¹-Testes konnten keine frühen Spermatogenesestadien nachgewiesen werden (Abb. 2.17 I-K). Adulte *ball*¹-mutante Testes enthalten also weder Keimbahnstammzellen noch frühe Spermatogenesestadien. *ball* ist damit in der männlichen Keimbahn essentiell für den Erhalt der Keimbahnstammzellen.

Bezüglich der Hubzellen konnten in den adulten Testes des homozygoten *ball*¹-Allels ebenfalls Effekte beobachtet werden. In den mutanten Testes waren die Hubzellen über die β -Gal-Expression nur in wenigen Fällen schwach nachweisbar (Abb. 2.17 H,L). Versuche, die Hubzellen in homozygot mutanten *ball*¹-Testes mit Antikörperfärbungen gegen einen anderen Hubzellmarker Fasciclin III (Brower et al., 1981) nachzuweisen, waren ebenfalls erfolglos (ohne Abbildung). Allerdings sind die Hubzellen, wie in 2.6.3 (Abb. 2.12 N) beschrieben, während der Larvenentwicklung noch vorhanden.

2.6.8 Die Funktion von *bällchen* in der männlichen Keimbahn ist keimzellautonom

Wie in 2.6.2 (Abb. 2.11) beschrieben, wird *ball* in Keimzellen und im Gonadensoma exprimiert. Um zu zeigen, dass die spezifische Aktivität von *ball* in den Keimzellen für den Gonadenphänotyp verantwortlich ist, wurde *ball* mit Hilfe des GAL4/UAS-Systems ektopisch in der männlichen Keimbahn mutanter *ball*²-Individuen exprimiert (Brand und Perrimon, 1993; siehe 4.4.11). Dazu wurden transgene Fliegen hergestellt, welche die gezielte Expression eines BallGFP-Fusionsproteins unter Kontrolle von UAS-

Sequenzen erlauben (siehe 4.4.10). Diese UAS-Sequenzen induzieren bei Bindung des Transkriptionsfaktors GAL4 die Expression des BallGFP-Fusionsproteins. Der Transkriptionsfaktor GAL4 wurde von einer "Treiberlinie" in Form eines Transgens bereitgestellt, welches GAL4 unter Kontrolle von Enhancern des Gens *nanos* (*nos*) gerichtet in der Keimbahn exprimiert (van Doren et al., 1998; siehe 4.4.4; 4.4.11). In Abbildung 2.18 A-E ist das Ergebnis der ektopischen *ball*-Expression in der Keimbahn männlicher Larvengonaden von homozygot mutanten *ball*²-Individuen gezeigt. Der *nos*GAL4-Treiber führt zu einer deutlichen Expression von *ball* in den Nuklei der Keimbahnstammzellen und deren Tochterzellen (Abb. 2.18 A). In späteren Spermatogenesestadien ist die *ball*-Expression nicht mehr nachweisbar. Der Nachweis der Expression erfolgte mit Anti-Ball-Antikörperfärbungen (siehe 4.2.15).

Die Auswirkungen dieser Expression auf die Keimzellzahl wurde in Antikörperfärbungen zum Nachweis der Keimzellen (Anti-Vasa-Antikörper; siehe 4.3.5) und der Spektrosome und Fusome (mAb1B1; siehe 4.3.5) untersucht. Wie im Vergleich der Abbildungen 2.18 B und C zu sehen, führt die keimzellspezifische Expression von *ball* in männlichen mutanten *ball*²-Larvengonaden zu einer Zunahme der Keimzellzahl. Die in der Gonadenspitze enthaltenen Keimzellen weisen punktförmige Spektrosome auf und scheinen damit Stammzellen beziehungsweise Gonialblasten zu sein (Abb. 2.18 B). Ferner sind differenzierende Keimzellzysten zu finden, die von verzweigten Fusomen durchzogen sind. In DNA-Färbungen wird ebenfalls die Zunahme von frühen Spermatogenesestadien im Bereich der Testisspitze deutlich (vergleiche Abb. 2.18 D und E).

Für die Rettungsversuche im adulten Testis von homozygot mutanten *ball*¹-Individuen wurde das im 5'-Bereich des *ball*-Gens liegende EP-Element, wie schon unter 2.3.3 beschrieben, für die ektopische Expression von *ball* genutzt. Die keimzellspezifische Expression mit dem *nos*GAL4-Treiber kann, wie in Abbildung 2.18 F gezeigt, mit Anti-Ball-Antikörpern in einigen frühen Keimzellstadien in der Testisspitze nachgewiesen werden. Auch bei diesen Rettungsversuchen führt die ektopische Expression von *ball* zu einer deutlichen Zunahme der Keimzellzahl in den mutanten *ball*¹-Gonaden (Abb. 2.18 G-J). Mit Antikörperfärbungen konnten in der Testisspitze Spektrosomhaltige Keimbahnstammzellen und Gonialblasten nachgewiesen werden, gefolgt von Zysten mit Fusomhaltigen späteren Entwicklungsstadien (Abb. 2.18 H). Hubzellen

konnten mit mAb7G10-Antikörpern (siehe 4.3.5) ebenfalls identifiziert werden, sie befinden sich in Abbildung 2.18 H allerdings außerhalb der Fokusebene und sind daher

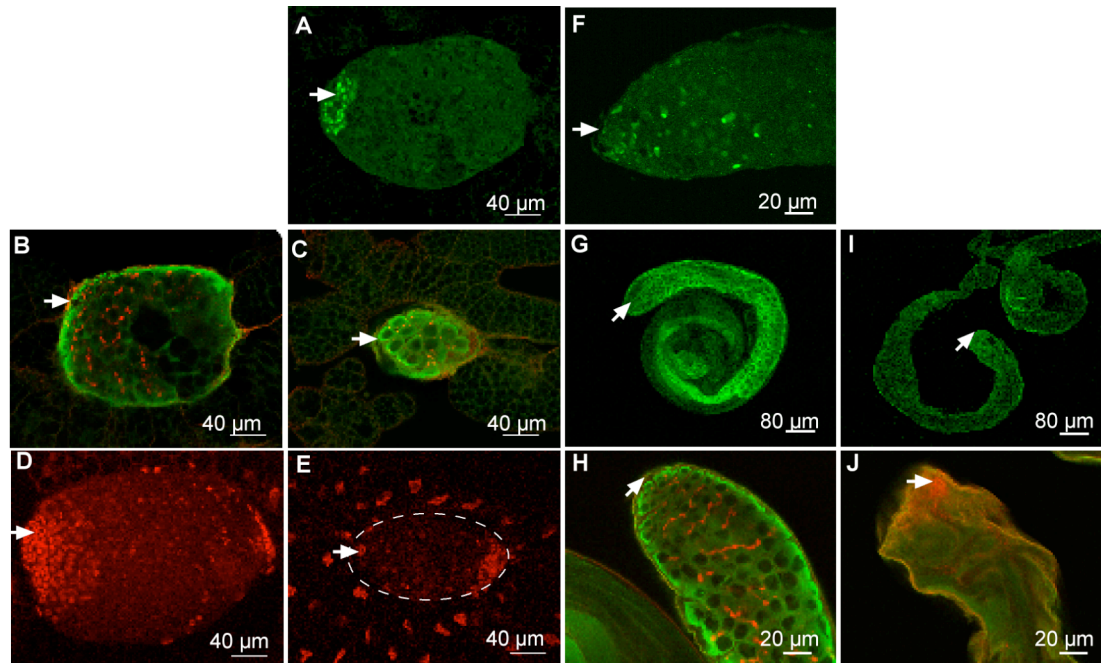


Abb. 2.18: Die ektopische Expression von bällchen rettet den *ball*-Phänotyp in den mutanten Allelen *ball*¹ und *ball*².

Konfokalmikroskopische Darstellung der *ball*-Expression (anti-Ball in grün in A und F), der Keimzellen (anti-Vasa, grün), Hubzellen (mAb7G10, rot) und der Fusome (mAb1B1, rot). (A-C): UAS/*GAL4* vermittelte Expression des UAS*ball*/GFP-Transgens in den Keimzellen homozygot mutanter *ball*²-Larven mittels *nos**GAL4*-Treiber. Nachweis der ektopischen *ball*-Expression in frühen Spermatogenesestadien in Hubnähe (Pfeil, A). Die Expression führt zur Zunahme der Keimzellzahl (B). Im Vergleich dazu eine Gonade des homozygoten *ball*²-Allels (D). Die DNA-Färbung (rot in C) zeigt die Zunahme von Stammzellen, Gonialblasten und Spermatogonien in der Testisspitze (Pfeil) als Folge der ektopischen *ball*-Expression. (D,E): larvale Vergleichsgonaden des homozygoten *ball*²-Allels. (F-H): EP-Element vermittelte *ball*-Expression im adulten Testis von homozygoten *ball*¹-Mutanten. Der *nos**GAL4*-Treiber exprimiert *ball* in Keimzellen in Hubnähe (Pfeil, F). Die ektopische Expression führt zur Zunahme der Keimzellen in der Testisspitze (G,H). (I,J): Vergleichsgonade eines adulten homozygoten *ball*¹-Männchens.

nicht zu sehen. Testisquetschpräparationen (ohne Abbildung) zeigten, dass an der Testisbasis mehr elongierte Spermien zu finden waren als in homozygot mutanten Testes des *ball*¹-Allels. Ein Teil der Spermien vereinzelt und war mobil. Fertilitätstests (siehe 4.4.1) zeigten, dass einige Männchen sogar ihre Fertilität wiedererlangt hatten.

Die Ergebnisse belegen, dass der Proliferationsphänotyp der Keimzellen in beiden Allelen durch die Expression von *ball* in den Keimzellen geheilt und die Fertilität der *ball*¹-Männchen prinzipiell wieder hergestellt werden kann. Damit ist die Funktion von *ball* in der männlichen Keimzellentwicklung keimzellautonom.

3 Diskussion

Die Spermatogenese von *Drosophila* bildet ein leicht zugängliches und übersichtliches experimentelles System zur Untersuchung der Mechanismen, die den Erhalt und die Proliferation von Stammzellen in der Nische bewirken (siehe 1.2). Die Fähigkeit zur Selbsterneuerung durch asymmetrische Teilung wird durch extrinsische Signale aus der Nische, wie dem JAK/STAT-Signalweg, und durch intrinsische Faktoren kontrolliert (siehe 1.4). Über die intrinsischen Mechanismen ist bislang wenig bekannt. Möglichkeiten für die Stammzell-autonome Regulation bieten zelluläre Mechanismen der Polarisierung, wie z.B. die Spindelorientierung, die asymmetrische Lokalisierung von Zellschicksalsregulatoren und die Regulation des Zellzyklus. Das Spermatogenesesystem wurde in dieser Arbeit für die Funktionsanalyse des Gens *ball* genutzt, das aufgrund des beschriebenen Keimzell-Phänotyps in Männchen ein solcher Stammzellfaktor sein könnte.

3.1 Das VRK1-Homolog *ball* ist essentiell für die Entwicklung von *Drosophila*

Bei *ball* handelt es sich um ein 599 Aa langes Protein mit zentral gelegener Serin/Threonin-Kinasedomäne. Während die N-terminalen und C-terminalen Bereiche des Proteins nicht konserviert sind, zeigt die Kinasedomäne Sequenzübereinstimmungen mit Mitgliedern der Familie der VRK1 von anderen Spezies (siehe 2.3). Bei den VRK1 handelt es sich um bislang wenig charakterisierte Kinasen, die in hochproliferativen Geweben meist nukleär angereichert sind (Nezu et al., 1997; Zelko et al., 1998). In *Drosophila* scheint es ein weiteres VRK1-Homolog mit dem Namen *VRK* (Flybase ID: FBgn0027504) zu geben. Auch bei diesem Gen bezieht sich die Sequenzähnlichkeit nur auf die Kinasedomäne (siehe 2.3). Allerdings befindet sich innerhalb der Kinasedomäne ein Einschub von 321 Aa-Resten, der nicht konserviert ist. Über die Funktion dieses Gens im Organismus ist nichts bekannt. Da eine Null-Mutation von *ball* zum Absterben der Tiere führt, scheinen Redundanzen zwischen diesen beiden VRK-Homologen zumindest in Bezug auf die essentielle Funktion von *ball* für die Lebensfähigkeit keine Rolle zu spielen. Ebenso ist

nicht klar, ob dieses weitere VRK- Gen für eine funktionelle Kinase codiert. Für *ball* konnte die Kinaseaktivität *in vitro* bereits bestätigt werden (Aihara et al., 2004).

Die Charakterisierung von *ball* erfolgte mittels zweier mutanter Allele von *ball*: einem hypomorphen und einem amorphen Allel. Bei dem hypomorphen Allel handelt es sich um eine EP-Element-Insertionsmutante, bei der das EP-Element im 5'-Bereich der transkribierten Sequenz in direkter Nähe zum Translationsstart von *ball* inseriert (siehe 2.3.1). Homozygot mutante Tiere dieser Linie sind lebensfähig, zeigen aber einen Sterilitätsphänotyp, der auf die homozygoten Männchen beschränkt ist. Durch Reversion des EP-Elements konnte die Fertilität in homozygoten Männchen wiederhergestellt werden, wodurch die EP-Element-Insertion für die Sterilität der Männchen verantwortlich gemacht werden konnte (siehe 2.3.2). Das EP-Element konnte zudem für die Überexpression des dahinter gelegenen *ball*-Gens genutzt werden. Mittels Überexpression von *ball* in der Keimbahn von homozygot mutanten Männchen des *ball*-Allels wurde ebenfalls eine Wiederherstellung der Fertilität der Männchen erreicht und damit gezeigt, dass *ball* für den Sterilitätsphänotyp verantwortlich ist (siehe 2.3.3). Dieses Allel von *ball* erhielt den Allelnamen *ball*¹.

Durch die Remobilisierung der EP0863-Insertion wurde ein amorphes Allel, *ball*², hergestellt (siehe 2.4.1). Dieses Allel ist homozygot letal. Die homozygot mutanten Tiere sterben früh während der Puppenentwicklung. In den Puppen scheint es zu keiner Neubildung von adulten Geweben zu kommen (siehe 2.5.1). Dafür spricht auch das Fehlen von Imaginalscheiben in den mutanten Larven dieses Allels, aus denen während der Metamorphose die adulten Strukturen hervorgehen (siehe 2.5.1).

Bei diesem Allel wurde das EP-Element bis auf 2.697 kbp im 5'-Bereich entfernt und darüber hinaus eine 152 Bp genomische Sequenz umfassende Deletion im angrenzenden 5'-Bereich des *ball*-Gens geschaffen (siehe 2.4.3). Dadurch wurde der Transkriptionsstart von *ball* entfernt. Das nächste mögliche Startcodon befindet sich 271 Bp in 3'-Richtung im offenen Leserahmen (ORF). Damit würde, im Falle einer Translation, die ATP-Bindestelle innerhalb der Kinasedomäne fehlen. Bezüglich der Kinaseaktivität wäre das resultierende Protein funktionslos. Überexpressionsstudien von *ball*-Protein in der Keimbahn homozygot mutanter Laven zeigten die allelische Zugehörigkeit zu *ball*: In den männlichen Gonaden konnte der mutante Phänotyp von

*ball*², der in einer Reduktion der Keimzellzahl besteht, durch die ektopische Expression von *ball* geheilt werden (siehe 2.6.8).

Die Stärke der mutanten *ball*-Allele wurde genetisch durch Kreuzungen mit einer Defizienzlinie, die als Nullallel von *ball* diente, bestimmt (siehe 2.4.4). Die unveränderte puppale Letalität des *ball*²-Allels in Kombination mit der Defizienz zeigt den amorphen Charakter dieses Allels. Das gleiche gilt für den Phänotyp, der die Keimzellentwicklung männlicher *ball*²-Larven betrifft: Die Reduktion der Keimzellzahl in *ball*² ist in Kombination mit der Defizienz nicht verstärkt. Zusammen mit den molekularen Daten wird *ball*² als Null-Allel eingestuft. In beiden mutanten Allelen von *ball* sind *ball*-Transkripte in Embryonen nachweisbar, allerdings ist der maternale Anteil daran nicht bekannt (siehe 2.3.1 und 2.4.3).

Ausser diesen beiden Allelen wurde bei der Reversion des EP-Elements ein weiteres Allel, *ball*³, hergestellt (siehe 2.4.1). Bei diesem Allel kam es zu einer Entfernung des 5'-Bereichs der EP-Insertion und darüber hinaus zu einer Deletion von in 5'-Richtung gelegener genomischer Sequenz (siehe 2.4.2). Von dieser Deletion ist auch das benachbarte Gen *histon 2Av* (*his 2Av*) betroffen. Allelische Tests mit einer Nullmutation des *his 2Av*-Gens bestätigten, dass es sich bei *ball*³ um eine Doppelmutante handelt (siehe 2.4.4). Aus diesem Grund wurde dieses Allel nicht für die phänotypische Analyse von *ball* verwendet.

3.2 *ball* wird in embryonalen Stammzellpopulationen exprimiert und für die Entwicklung proliferierender Gewebe benötigt

Maternal eingebrachte *ball*-Transkripte sind anfangs ubiquitär im Embryo verteilt (siehe 2.2; Abb. 2.3). Während der mitotischen Teilungszyklen (Einteilung der Stadien nach Foe et al., 1993) bleibt *ball* im elongierenden Keimstreif angereichert. Vom embryonalen Entwicklungsstadium 11 an finden mitotische Proliferationen verstärkt nur noch in den epidermalen Sensillen, im ZNS und in den Keimzellen statt (Übersichtsartikel: Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Die Expression von *ball* scheint mit diesen Proliferationsprofil zu korrelieren: auch die *ball*-Transkripte konzentrieren sich während der weiteren Embryonalentwicklung zunehmend auf das ZNS, wo *ball* in einem zeitlich dynamischen Muster in Neuroblasten exprimiert wird.

Gegen Ende der Embryogenese sind *ball*-Transkripte dann in den Keimzellen nachweisbar, die nun mit der Proliferation beginnen (Übersichtsartikel: Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Neuroblasten und Keimzellen bilden embryonale Stammzellpopulationen. In diesen Stammzellen bleibt die Expression von *ball* auch während der folgenden Larvenentwicklung nachweisbar. Im larvalen Gehirn wird *ball* in den optischen Loben, in denen die Neuroblasten bis in die späte Larvenentwicklung hinein proliferieren, exprimiert (White und Kankel, 1978; Truman und Bate, 1988; Hofbauer und Campos-Ortega, 1990).

In der Keimbahn kann die *ball*-Expression in Männchen und in Weibchen während der gesamten Entwicklung, einschließlich der adulten Fliege, nachgewiesen werden. Dabei sind Transkripte schon während der frühen Keimzellentwicklung an Orten der Stammzellproliferationen im Germarium der Weibchen und in der Testisspitze der Männchen nachweisbar. Dieses Expressionsmuster von *ball* in proliferierenden Geweben und in Stammzellpopulationen lässt vermuten, dass *ball* eine Funktion bei der Proliferation von Stammzellen haben könnte. Weitere Hinweise auf eine solche Funktion von *ball* ergab die phänotypische Analyse der Mutanten. Die embryonale Entwicklung des ZNS und der Keimzellen scheint bei diesen nicht gestört zu sein (siehe 2.5.2). Ein Grund dafür könnte eine starke maternale *ball*-Komponente sein. Es besteht die Möglichkeit, dass maternales *ball*-Protein zygotische Defekte von *ball* im Embryo maskiert. Versuche, die maternale Komponente durch Herstellung von *ball*-Keimbahnklonen auszuschalten, hatte den Ausfall ablagereifer Eier zur Folge. Versuche, die maternale Komponente in den Embryonen zu reduzieren, indem homozygote *ball*¹-Jungfrauen mit Männchen des balanzierten *ball*²-Allels verkreuzt und die transheterozygoten *ball*¹/*ball*²-Nachkommen untersucht wurden, führten zu keinen mutanten Phänotypen in ZNS und Gonaden oder zu Veränderungen bezüglich der Lebensfähigkeit und Fertilität. Damit scheint selbst eine reduzierte *ball*-Aktivität im Embryo noch ausreichend für die Entwicklung von ZNS und Keimbahn zu sein.

Während der folgenden Larvenentwicklung werden dann aber Defekte in der Entwicklung des Nervensystems und der Keimbahn sichtbar (siehe 2.5.3). Das Gehirn ist in Larven von homozygot mutanten *ball*²-Individuen im Vergleich zu Gehirnen von Wildtyp-Larven und homozygot mutanten Larven des *ball*¹-Allels deutlich reduziert (Abb. 2.9). Betroffen sind vor allem die optischen Loben. In beiden mutanten Allelen

ist die Zahl der Keimzellen in den Gonaden reduziert, wobei dieser Phänotyp im hypomorphen Allel auf die männliche Keimbahn beschränkt ist.

ball-Aktivität wird aber nicht nur in den Stammzellen des Nervensystems und der Keimbahn benötigt. Die Imaginalscheiben sind in den mutanten Larven des *ball²*-Allels ebenfalls reduziert (siehe Abb. 2.9). Das Imaginalscheibenepithel ist ebenfalls ein stark proliferierendes larvales Gewebe (Übersichtsartikel: S. Cohen, 1993). Darüber hinaus ist die larvale Entwicklung im mutanten *ball²*-Allel global verzögert (siehe 2.5.1). Da die Entwicklung der Larven von den Lebens- und Futterbedingungen abhängig ist, könnte die Entwicklungsverzögerung von Defekten des Nervensystems herrühren, die zu Einschränkungen in Bewegungsfähigkeit und Futteraufnahmen führen können.

Die von Defekten betroffenen Gewebe in mutanten *ball*-Larven sind durch eine starke Proliferation während der Larvenentwicklung gekennzeichnet. Die Phänotypen in diesen Geweben weisen damit auf eine Funktion von *ball* in der Proliferation hin. Darüber hinaus lassen das spezifische Expressionsmuster in embryonalen Stammzellpopulationen, den Neuroblasten und in primären Keimzellen zusammen mit den Phänotypen in diesen Geweben eine mögliche Stammzell-spezifische Funktion vermuten.

3.3 *ball*-Aktivität wird für Erhalt/Proliferation der Keimbahnstammzellen in Männchen benötigt

Als experimentelles System zur Untersuchung möglicher Funktionen von *ball* hinsichtlich der Proliferation von somatischen Zellen und Stammzellen diene die Entwicklung der Keimzellen in der männlichen Keimbahn.

Die Proliferation beginnt dort bereits während der frühen Larvenentwicklung (siehe 1.2). In den Gonaden des ersten Larvenstadiums sind bereits Spermatogonienzysten zu finden (Sonnenblick, 1941). Die Spermatogenese verharret am Ende der primären Spermatozytenreifung bis zum Beginn der Verpuppung. In den larvalen Wildtyp-Gonaden können also die Stammzellproliferationen und die frühen Stadien der Keimzelldifferenzierung beobachtet werden.

Die Keimbahnstammzellen sind durch ihre Nähe zu den Hubzellen und durch punktförmige Spektrosome gekennzeichnet (Übersichtsartikel: Fuller, 1993). In den

entwickelnden Zysten verzweigen diese Strukturen und bilden Fusome (siehe 1.2). Am Ende der mitotischen Amplifizierungsrunden kommt es in Verbindung mit hoher Transkriptionsaktivität zu einem starken Wachstum der Keimzellen (siehe 1.2). Anhand dieser Charakteristika konnte für *ball*-mutante Larvengonaden in Antikörperfärbungen der Keimzellen festgestellt werden, dass es in den mutanten Gonaden zum Verlust der Keimbahnstammzellen kommt (siehe 2.6.5). In *ball*²-mutanten Gonaden konnten nur vereinzelt Keimzellen in der Stammzellnische nachgewiesen werden (Abb. 2.14). Da diese Zellen relativ groß waren und einen ebenfalls großen Nukleus besaßen, handelt es sich hierbei vermutlich nicht mehr um Stammzellen, sondern um bereits differenzierende Keimzellen. Diese Beobachtung konnte durch DNA-Färbungen der Keimzellen bestätigt werden (Abb. 2.15). Weitere Hinweise darauf, dass *ball* spezifisch für die Proliferation bzw. den Erhalt der Keimbahnstammzellen verantwortlich ist, liefert die Beobachtung, dass die Fähigkeit zur Teilung der Gonialblasten in *ball*-mutanten Gonaden scheinbar nicht gestört ist: Die enthaltenen Keimzellzysten weisen Fusome auf und enthalten mindestens acht Keimzellen (Abb. 2.14). Auch die Differenzierung scheint in den mutanten Keimzellen zu erfolgen: Die Größe der Zellen und Kerne spricht dafür, dass die Keimzellen mit dem umfangreichen Transkriptionsprogramm der primären Spermatozytenreifung begonnen haben. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass diese Proliferations- und Differenzierungsereignisse sehr früh in der Larvenentwicklung stattfanden und damit möglicherweise noch unter dem Einfluss maternalen *Ball*-Proteins standen.

Einen weiteren Hinweis darauf, dass die *ball*-Aktivität spezifisch für den Erhalt der Stammzellen benötigt wird, liefert das hypomorphe Allel *ball*¹. In diesem homozygot lebensfähigen Allel kann die Spermatogenese adulter Tiere untersucht werden, in denen Keimzellen kontinuierlich durch Stammzellteilungen in der Testisspitze gebildet werden und ausdifferenzieren (siehe 2.6.6). Auch in den adulten Testes des homozygot mutanten *ball*¹-Allels sind keine Stammzellen enthalten (Abb. 2.17). Zysten mit frühen Keimzellstadien waren nur vereinzelt zu finden. Die mutanten Testes können einige elongierte Spermien enthalten (siehe 2.6.6; Abb. 2.16). Da keine Stammzellen vorhanden sind, scheinen diese Spermien aus den larvalen Keimzellen hervorgegangen zu sein. Auch hier weisen das Fehlen früherer Entwicklungsstadien und die wenigen elongierten Spermien auf eine Störung der Stammzellproliferation hin.

Bei den elongierten Spermien treten allerdings weitere Defekte auf: die homozygot mutanten Männchen des hypomorphen *ball*¹-Allels sind steril, die Spermien vereinzeln nicht und sind nicht mobil (siehe 2.6.6). Diese Defekte können ein Hinweis auf eine weitere Funktion von *ball* während der Differenzierung der Keimzellen sein. Möglicherweise handelt es sich hierbei aber auch um einen Sekundäreffekt, der seinen Ursprung in Störungen während der frühen Keimzellentwicklung hat. Da die einzelnen Prozesse der Spermatogenese weitgehend unabhängig voneinander reguliert sind, ist es möglich, dass gravierende Schäden während der frühen Spermatogenese nicht zum Abbruch der Spermatogenese führen. Ein Beispiel dafür bildet das *cdc25*-Homolog in *twine*. In mutanten Männchen ist die Chromosomensegregation und Cytokinese während der Meiose der Spermatozyten gestört. Die Spermien differenzieren trotzdem aus, sind allerdings steril (Alphey et al., 1992; Courtot et al., 1992). Defekte während der frühen Keimzellproliferationen in *ball*-mutanten Testes könnten analog für die Immobilität und Sterilität der Spermien verantwortlich sein.

3.4 Die zellautonome *ball*-Aktivität reicht für den Erhalt der Keimbahnstammzellen aus

ball wird in den männlichen Gonaden in Keimbahn und im Soma exprimiert (siehe 2.6.2; Abb. 2.11). Untersuchungen der somatischen Komponenten zeigten, dass auch diese in *ball*-mutanten Testes betroffen sind (siehe 2.6.3). Die Anzahl somatischer Zystzellen, welche paarweise die entwickelnden Keimzellzysten umgeben, ist in larvalen Gonaden mutanter *ball*-Männchen reduziert (Abb. 2.12). Die somatischen Hubzellen in der Gonadenspitze sind zwar in den larvalen Gonaden beider mutanter *ball*-Allele vorhanden, konnten in adulten Testes von homozygot mutanten *ball*¹-Männchen aber nur in Einzelfällen schwach nachgewiesen werden (Abb. 2.17).

Zwischen den genannten somatischen Zellen und den Keimzellen besteht ein enger gegenseitiger regulatorischer Kontakt (Gönczy und DiNardo, 1996). Die Hubzellen bilden die Stammzellnische und regulieren darüber die frühe Keimzellentwicklung (siehe 1.4). Die Zystzellen sind ebenfalls an der Regulierung des Stammzellerhalts und der weiteren Differenzierung der Keimzellen beteiligt (siehe 1.4).

Um zu sehen, ob *ball* Keimzellautonom für deren Erhalt benötigt wird, wurde *ball* in Form eines Transgens im UAS/GAL4-System in der Keimbahn der mutanten *ball*-Allele überexprimiert (siehe 2.6.8).

Mit Hilfe von *nanos*-Promotorsequenzen transgenabhängig exprimiertes *ball*-Protein (siehe 2.6.8) konnte danach in wenigen frühen Keimzellentwicklungsstadien in Nähe der Testisspitze nachgewiesen werden (Abb. 2.18). Diese Expression während der frühen Spermatogenese scheint ausreichend zu sein, um die Zahl der Keimzellen in den mutanten *ball*²-Testes zu erhöhen (Abb. 2.18). Neben einer deutlichen Zunahme der Stammzellen und Gonialblasten enthalten diese Gonaden Zysten mit differenzierenden Keimzellen. Diese Beobachtungen wurden auch im hypomorphen Allel bestätigt. Hier erfolgte die Überexpression von *ball* über UAS-Sequenzen des EP0863-Elements (siehe 2.3). Auch hier kann die ektopische Expression von *ball* durch den *nos*GAL4-Treiber in den frühen Stadien der Spermatogenese in Nähe des Testistips in adulten homozygot mutanten *ball*¹-Tieren nachgewiesen werden (Abb. 2.18). Die Ektopische *ball*-Expression führte in homozygot mutanten *ball*¹-Gonaden zu einer Bevölkung der Stammzellnische mit Stammzellen (Abb. 2.18). Ferner waren die Testes gefüllt mit Keimzellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien, was auf eine kontinuierliche Produktion von Keimzellen in der Testisspitze schließen lässt. Unter den ausdifferenzierten Keimzellen waren auch mobile Spermien zu finden. Die Fertilität dieser Männchen konnte in einigen Fällen wiederhergestellt werden. Darüber hinaus waren die somatischen Hubzellen in diesen Testes in Antikörperfärbungen wieder nachweisbar. Damit scheint das Fehlen der Hubzellen in adulten homozygot mutanten *ball*¹-Männchen von Defekten der Keimzellen herzurühren.

Es ist bekannt, dass die Bildung der Hubzellen und der Zystzellen zunächst unabhängig von der Keimbahn erfolgt und die Keimzellen erst im Verlauf der Spermatogenese Einfluss auf das Soma nehmen (Gönczy und DiNardo, 1996).

Die Ergebnisse zeigen, dass *ball*-Aktivität spezifisch in den Keimzellen für deren Erhalt, kontinuierliche Produktion und Fertilität benötigt wird. Für diese Funktionen ist die Expression von *ball* in den Stammzellen und Gonialblasten ausreichend. Dies kann als weiterer Hinweis darauf gewertet werden, dass der Verlust der Keimzellen auf Defekte während der frühen Stammzell- und/oder Gonialblastenproliferationen zurückzuführen ist und *ball*-Aktivität dort benötigt wird.

3.5 *ball*-Aktivität wird *p53*-unabhängig zum Überleben der Keimzellen in Männchen benötigt

Die männlichen Gonaden von Larven, die homozygot für die mutanten *ball*-Allele sind, enthalten weniger Keimzellen als vergleichbare Wildtyp-Larven. Eine Degeneration der Keimzellen könnte ein möglicher Grund für die Reduzierung der Keimzellzahl sein. Antikörperfärbung gegen die aktivierte Form der Effektor-Caspase Drice (Yu et al., 2002) zeigten eine deutliche Zunahme von Apoptosesignalen in den mutanten Gonaden des *ball²*-Allels (siehe 2.6.4, Abb. 2.13). Die mutanten Gonaden des hypomorphen *ball¹*-Allels allerdings zeigten keine Zunahme der Apoptosesignale im Vergleich zu Wildtypgonaden. Für eine zumindest eingeschränkte Apoptose spricht auch die Tatsache, dass in den adulten Testes des homozygoten *ball¹*-Allels noch wenige ausdifferenzierte Keimzellen enthalten sein können. Möglicherweise reicht die reduzierte *ball*-Aktivität aus, um Keimzellen zu erhalten. Es ist allerdings ebenso denkbar, dass die Apoptose in den Keimzellen zu einem anderen Zeitpunkt in der Entwicklung oder lediglich in einem engen Zeitfenster auftritt und deswegen mit den Färbungen nicht erfasst wurde.

Apoptose könnte eine Reaktion auf vorangegangene Schädigungen der Keimzellen, hervorgerufen durch den *ball*-Aktivitätsverlust, sein. Der programmierte Zelltod durch Apoptose wird durch extrazelluläre und intrazelluläre Zellstresssignale, wie z. B. ultraviolette Strahlung oder DNA-Schäden und Störungen des Zellzyklus ausgelöst (Übersichtsartikel: Jacobson et al., 1997). Diese Signale führen über verschiedene Signalwege zur Aktivierung von Effektor-Caspasen. Die aktivierten Caspasen bewirken den programmierten Zelltod durch Proteolyse von intrazellulären Proteinen (Übersichtsartikel: Meier et al., 2000; Adams, 2003).

Eine zentrale Rolle bei der Vermittlung zellulärer Stresssignale in Säugern spielt das proapoptotische Protein P53 (Übersichtsartikel: Levine, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass VRK1 durch Phosphorylierung von P53 *in vivo* in Zellkultur einen regulierenden Einfluß auf dessen Stabilität und damit verbundene Aktivität besitzt (Lopez-Borges und Lazo, 2000; Vega et al., 2004). Dieses proapoptotische Gen ist in *Drosophila* (*Dmp53*) strukturell und funktionell konserviert (Ollmann et al., 2000). Über die Regulation von *Dmp53* ist bislang wenig bekannt. *Ball* könnte, homolog zu

der Funktion von VRK1 in Säugern, einen möglichen Regulator von Dmp53 darstellen. In Embryonen konnte gezeigt werden, dass *Dmp53* in den Keimzellen exprimiert wird (Ollmann et al.; 2000). Eine Interaktion mit Ball wäre damit prinzipiell möglich. Zudem interagieren die beiden Proteine im YTH-System *in vivo* in Hefe (T. Herzig, persönliche Mitteilung). Da in den *ball*²-mutanten Gonaden der Verlust von *ball*-Aktivität zu vermehrter Apoptose in den Keimzellen führt, müsste eine mögliche Phosphorylierung von Dmp53 durch Ball inhibitorisch auf die proapoptische Funktion von Dmp53 wirken. Um diese Möglichkeit zu testen, wurden Larvengonaden von Männchen untersucht, die gleichzeitig mutant für *ball* und für das lebensfähige Nullallel von *Dmp53* waren (siehe 2.6.4). Für den Fall, dass *ball* ein Negativregulator wäre, hätte der Funktionsverlust beider Gene eine Reduzierung der Apoptose zur Folge. Dies konnte in den Doppelmutanten allerdings nicht festgestellt werden (Abb. 2.13). Die Ergebnisse zeigen, dass die Apoptose in *ball*-mutanten männlichen Gonaden nicht von einer inhibitorischen Interaktion von Ball auf Dmp53 herrührt. Damit scheint die Apoptose in den *ball*-mutanten Gonaden unabhängig von dem proapoptotischen Faktor *Dmp53* reguliert zu werden. Für das Säugerhomolog ist bereits bekannt, dass dieser wichtige Apoptoseregulator nicht in allen Apoptosewegen von Bedeutung ist (Lowe et al., 1993).

3.6 Mögliche Ursachen für die Proliferationsstörung in den Stammzellen

Störungen der Stammzellproliferation können zum Absterben der Stammzellen oder zum Verlust des Stammzellcharakters verbunden mit der Ausdifferenzierung der Keimzellen führen. Keimzellautonom könnten die Ursachen in Defekten während der Polarisierung der Stammzellen oder bei der asymmetrischen Verteilung/Aktivierung von Stammzell- bzw. Differenzierungs determinanten bestehen.

Für die Polarisierung der Stammzellen sind extrinsische Signale aus der Stammzellnische verantwortlich (Kiger et al., 2001; Tulina und Matunis, 2001; Shivdasani und Ingham, 2003; Kawase et al., 2004; Schulz et al., 2004; siehe 1.4). Wie diese von der Stammzelle umgesetzt werden ist bislang nicht klar. Innerhalb der Stammzellen ist die Orientierung der Spindel für die Polaritätsbildung wichtig. Sie entscheidet durch die Lage der entstehenden Tochterzellen über deren Entwicklungsschicksal (Yamashita et al., 2003). Veränderungen der

Spindelorientierung führen dazu, dass beide Tochterzellen in der Nische zu liegen kommen und Stammzellcharakter annehmen oder aber beide in unüblich weiter Entfernung von Tip gebildet werden und ihren Stammzellcharakter verlieren (Yamashita et al., 2003). Es gibt bislang keine Hinweise darauf, dass aus den Stammzellteilungen zwei unterschiedlich determinierte Tochterzellen hervorgehen. Asymmetrisch lokalisierte Determinanten sind bislang nicht bekannt. Ein relativ großes Entwicklungspotential der Tochterzellen und der regulatorische Einfluss der Stammzellnische wird auch in Repopularisierungsversuchen von leeren Stammzellnischen im adulten Testis deutlich. Dabei scheint eine Wiederbevölkerung der Nische mit Stammzellen durch Dedifferenzierung von Gonialblasten und frühen Spermatogonien zu erfolgen (Brawley und Matunis, 2004).

Einen möglichen intrinsischen Regulationsmechanismus könnte der Zellzyklus bilden. Im Testis von *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass Cyclin B, welches den Zellzyklus beim Eintritt in die Mitose kontrolliert, für den Erhalt der Keimbahnstammzellen notwendig ist (Wang und Lin, 2005). Störungen des Zellzyklus, wie z.B. der DNA-Synthese, Spindelausbildung oder Mitose können darüber hinaus zur Einleitung der Apoptose führen (Übersichtsartikel: Weaver und Cleveland, 2005).

3.7 Mögliche Beteiligung von *ball* an Proliferationsprozessen der Stammzellen in der männlichen Keimbahn

Färbungen mit Anti-Ball-Antikörpern liefern keine Hinweise auf eine möglichen Rolle von *ball* als asymmetrisch verteilte Determinante (Abb. 2.11). Eine asymmetrische Lokalisation von Ball z. B. während der Mitose kann aber auch nicht ausgeschlossen werden.

Die nukleäre Lokalisierung von Ball macht eine Beteiligung des Gens an Prozessen des Zellzyklus vorstellbar. Eine Funktion von *ball* ist an verschiedenen Punkten des Zellzyklus möglich. Als Kinase könnte Ball beim Aufbau der Spindel, bei der Chromatinkondensation und -Verteilung oder an der DNA-Synthese regulierend beteiligt sein. Letzteres findet Unterstützung durch Eigenschaften weiterer Familienmitglieder der VRK. Bei dem prototypischen Mitglied der VRK-Familie, die Vaccinia Virus Kinase B1, handelt es sich um eine essentielle virale Kinase, die für die

Synthese viraler DNA benötigt zu werden scheint (Rempel et al., 1990). Komplementationsversuche zeigten, dass diese Funktion von B1 auch von humanen und Maus-VRK1-Homologen übernommen werden kann (Boyle und Traktman, 2004). Eine Beteiligung bei der DNA-Synthese innerhalb des Zellzyklus könnte damit eine konservierte Funktion der VRK1-Familie darstellen. Diese Idee wird durch die gemeinsame Expression der VRK1-Homologen in stark proliferierenden Geweben (Nezu et al., 1997; Zelko et al., 1998) unterstützt.

Einen weiteren Hinweis auf eine Beteiligung von *ball* am Zellzyklus liefert die subzelluläre Lokalisierung des Proteins. In den Keimzellen lokalisiert *Ball* innerhalb des Nukleus wahrscheinlich in den stark ausgebildeten Nukleoli (Abb. 2.11). In diesen subnukleären Strukturen werden ribosomale Proteine gebildet (Tokayasu, 1974b; Bush und Smetana, 1970). Die ribosomale RNA-Synthese im Nukleolus wird unter anderem durch Chromatinstukturänderungen reguliert (Santoro und Grummt, 2001; Santoro et al., 2002; Übersichtsartikel: Grummt und Picaard, 2003). Außer der Ribosombiogenese wird dem Nukleolus auch eine Rolle bei Zellproliferation, Zellzykluskontrolle und Tumorgenese zugeschrieben (Tsai und McKay, 2002; Du und Stillman, 2002; Übersichtsartikel: Peterson, 1998).

Es ist nicht auszuschließen, dass *ball* eine allgemeine Funktion in der Proliferation und dem Wachstum von Zellen besitzt, deren Defekte vor allem in Zellen mit starker Proliferation sichtbar hervortreten. Die Abwesenheit von larvalen Imaginalscheiben, die ein stark proliferierendes Gewebe bilden, zeigt zumindest, dass *ball* noch eine Stammzell-unabhängige Funktion haben muss.

Eine interessante Möglichkeit für einen keimzellautonomen Mechanismus zum Erhalt von Stammzellen – auch im Rahmen des Zellzyklus – bietet die Fähigkeit von Ball zur *in vitro*-Phosphorylierung der Histonvariante His 2A am Threoninrest 119 (Aihara et al., 2004). Diese Phosphorylierung ist in Embryonen während der Mitose verstärkt nachweisbar und legt damit eine Beteiligung am Zellzyklus, DNA-Replikation oder Transkriptionsregulierung nahe (Aihara et al., 2004).

Posttranslationale Histonmodifizierungen spielen eine Rolle bei der Regulierung des Heterochomatins und damit verbundener Transkriptionskontrolle (Übersichtsartikel: Cheung et al., 2000; Fischle et al., 2003). Die Phosphorylierung von Histonen scheint bei verschiedenen Prozessen im Nukleus wie z.B. der Reparatur von DNA und

Apoptose eine Rolle zu spielen (Rogakou et al., 1999; Rogakou et al., 2000; Ward und Chen, 2001) und wird mit der Chromatinkondensation während der Mitose in Zusammenhang gebracht (Hsu et al., 2000; Goto et al., 1999; Übersichtsartikel: Bradbury et al., 1992.) Histonmodifizierungen sind an der Transkriptionskontrolle beteiligt. Phosphorylierte Histone können dabei als Anlagerungsstellen für Transkriptionsfaktoren dienen oder zur Regulation der Chromatinstruktur beitragen (Übersichtsartikel: Cheung et al., 2000).

Eine mögliche Regulierung des Stammzellerhalts durch Chromatinmodifizierungen wird bereits für das Gen *piwi* diskutiert. *piwi* wird in *Drosophila* in Keimbahn und Soma von männlichen und weiblichen Gonaden exprimiert und in beiden für den Erhalt der Keimbahnstammzellen benötigt (Lin und Spradling; 1997; Cox et al. 1998; Cox et al., 2000). Dieses Gen scheint zumindest in der weiblichen Keimbahn als Stammzell-autonomer Faktor die Teilungen der Stammzellen zu kontrollieren (Cox et al., 2000). *piwi* ist an der posttranskriptionellen RNA-Prozessierung im "RNA-Interference System" (RNAi) beteiligt (Pal-Bhadra et al., 2002). Das RNAi-System - und *piwi* - werden eine Rolle bei Bildung von Heterochromatin und Histonmodifizierungen zugeschrieben (Pal-Bhadra et al., 2004). *piwi* könnte über die Chromatinstruktur an der Regulation von Genexpression beteiligt sein. Eine ähnliche Rolle ist für *ball* denkbar. Als intrinsischer Stammzelleffektor könnte *ball* durch Phosphorylierung von Histone 2A Chromatinmodifizierungen bewirken, welche Stammzell-spezifische Gene für Transkriptionsfaktoren zugänglich machen oder die Expression von Differenzierungsgenen verhindern.

Als Kinase könnte Ball in den Keimzellen an der Vermittlung extrinsischer Signale beteiligt sein. Da die Stammzellnische wesentlichen Anteil am Erhalt der Stammzellen besitzt, ist es möglich, dass die *ball*-Aktivität durch Signale aus der Nische reguliert wird. Ein möglicher Regulator von *ball* in den Keimzellen wäre der JAK/STAT-Signalweg. Der Verlust früher Keimzellentwicklungsstadien in homozygot mutanten *ball*-Testes ähnelt stark den Defekten, die durch Störungen der JAK/STAT-Signaltransduktion im Testis verursacht werden (Kiger et al., 2001; Tulina und Matunis, 2001). Dieser Signalweg ist, wie *ball*, essentiell für den Erhalt der Keimbahnstammzellen. Lebensfähige Mutanten des JAK-Kinasegens *hopscotch* (*hop*) führen zum Verlust der Keimbahnstammzellen und Keimbahnstammzellen, die mutant

für das Transkriptionsfaktor-Homolog *stat92E* sind, verlassen die Stammzellnische und differenzieren aus (Kiger et al, 2001; Tulina und Matunis, 2001). Der Ligand dieses Signalwegs, Unpaired (Upd) wird von den somatischen Hubzellen sekretiert (Tulina und Matunis, 2001). Die Aktivierung dieses Signalwegs führt in den Keimbahnstammzellen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Stat92E (Kiger et al., 2001; Tulina und Matunis, 2001). Zielgene dieses Transkriptionsfaktors sind in den Keimbahnstammzellen bislang nicht identifiziert. Im genomischen Bereich 105 Bp in 5'-Richtung vor Beginn des Transkriptionstarts der Transkriptvariante *ball*-PA gelegen befindet sich ein STAT-Bindemotiv (H. R. Chung, persönliche Mitteilung). *In vitro* konnte die Fähigkeit zur Bindung des Transkriptionsfaktors Stat92E an diese Region bereits bestätigt werden (N. Abrouzova, persönliche Mitteilung). *ball* bildet damit ein potentiell Zielgen des JAK/STAT-Signalwegs in der männlichen Keimbahn für den Erhalt der Stammzellen in der Stammzellnische.

Neben der Expressionskontrolle scheint *ball*-Aktivität auf Proteinebene reguliert zu werden. Dies wird bei der ektopischen Expression von *ball* im Embryo deutlich (siehe 2.3.1). Die ektopische Expression von *ball* im Muster des Gens *engrailed* scheint keinen Einfluss auf das Überleben der Tiere zu haben, denn diese Embryonen entwickeln sich zu adulten Tieren. Darüber hinaus ist es möglich, dass es sich bei *ball* um eine konstitutiv aktive Kinase handelt, da *ball*, zumindest *in vitro*, die Fähigkeit zur Autophosphorylierung besitzt (Nichols und Traktman, 2004). Es ist daher wahrscheinlich, dass die *ball*-Aktivität vor allem durch die subzelluläre Lokalisierung oder durch Substratbeschränkung reguliert wird.

3.8 Mögliche Rolle von *ball* als allgemeiner Stammzellofaktor

Die Gemeinsamkeiten der Neuroblasten und Keimzellen hinsichtlich Multipotenz und Fähigkeit zur Selbsterneuerung der Stammzellpopulation lassen vermuten, dass sich die intrazellulären Regulationsmechanismen zum Erhalt der Entwicklungspotenz bzw. dem Schutz vor Differenzierung der Stammzellen ebenfalls ähneln.

Die Reduktion der optischen Loben in larvalen Gehirnen von homozygot mutanten *ball²*-Individuen zeigen, dass *ball*-Aktivität für die Entwicklung des ZNS benötigt wird (siehe 2.5.3; Abb. 2.9). Die Reduktion von Keimzellen in larvalen homozygot mutanten

*ball*²-Weibchen zeigt, dass *ball* auch für den Erhalt der weiblichen Keimbahn benötigt wird (siehe 2.6.1; Abb. 2.10). In den weiblichen Gonaden beginnt die Oogenese erst während der Puppenentwicklung (King, 1970; Lin und Spradling, 1993). Bis dahin enthalten die Gonaden lediglich proliferierende primäre Keimzellen. Ein Teil dieser Urgeschlechtszellen durchläuft wahrscheinlich ab der frühen Puppenentwicklung das Differenzierungsprogramm der Keimzellen ohne vorhergegangene Stammzellteilungen (King, 1970; Bhat und Schedl, 1997). Einige primäre Keimzellen beginnen als Stammzellen mit der kontinuierlichen Produktion von Cystoblasten durch asymmetrische Teilungen (Bhat und Schedl, 1997; Zhu und Xie, 2003). *ball* scheint damit in der weiblichen Keimbahn für die Entwicklung bzw. den Erhalt der primären Keimzellen benötigt zu werden.

Da *ball* in den Stammzellsystemen des ZNS sowie der männlichen und weiblichen Keimbahn eine Rolle zu spielen scheint, ist es gut möglich, dass *ball* einen gemeinsamen Faktor für den Erhalt von Stammzellen in diesen Stammzellsystemen darstellt.

In allen drei Stammzelltypen spielen somatische Stammzellnischen eine wichtige Rolle für die Regulation der Stammzellproliferationen (Übersichtsartikel: Spradling et al., 2001; Lin, 2002; Yamashita et al., 2005). An der Signalübermittlung sind Signaltransduktionswege wie der JAK/STAT- oder der TGF- β -Signalweg beteiligt. Allerdings scheinen die Prozesse, in denen die Signalwege wirken, nicht konserviert zu sein. Ein Beispiel dafür liefert der Vergleich der Regulation des Stammzellerhalts in der männlichen und weiblichen Keimbahn von *Drosophila*. Der JAK/STAT-Signalweg ist essentiell für den Erhalt der Keimbahnstammzellen in der männlichen Keimbahn (Kiger et al., 2001; Tulina und Matunis, 2001). In der weiblichen Keimbahn ist dieser Signalweg zwar für die Differenzierung der somatischen Zellen des Eifolikels notwendig, scheint aber für den Erhalt der Keimbahnstammzellen unbedeutend zu sein (Silver und Montell, 2001; Ghiglione et al., 2002; McGregor et al., 2002). Hier wird diese wichtige Funktion vom TGF- β -Signalweg vermittelt (Xie und Spradling, 1998). Dieser Weg wiederum ist auch in der männlichen Keimbahn aktiv, spielt aber für den Erhalt der Stammzellen eine untergeordnete Rolle (Shivdasani und Ingham, 2003; Schulz et al., 2004). Sollte die Expression von *ball* in der männlichen Keimbahn durch den JAK/STAT-Signalweg reguliert werden, wäre es bei gleicher Funktion als

Stammzellfaktor in der weiblichen Keimbahn wahrscheinlich, dass hier die Regulation auf anderem Wege erfolgt.

Für die asymmetrischen Stammzellteilungen in Nervensystem und Keimbahn könnte der Zellzyklus eine gemeinsame Rolle in den Stammzellsystemen spielen. Hinweise darauf liefern Mutanten verschiedener Zellzyklus-Komponenten in Nervensystem und Keimbahn von *Drosophila*. Cyclin B, welches den Eintritt in die M-Phase des Zellzyklus kontrolliert, wird in der Keimbahn für den Erhalt der Keimbahnstammzellen in Männchen und Weibchen benötigt (Lehner und O'Farrell, 1990; Wang und Lin, 2005). Im Nervensystem von *Drosophila* scheinen Cyclin B und Cyclin B3 in Neuroblasten gemeinsam an der Aufrechterhaltung der Asymmetrie während der Mitose beteiligt zu sein, ebenso wie die Cyclin-abhängigen Kinase Cdc2 (Tio et al., 2001). Wie der Zellzyklus auf den Erhalt der Stammzellen wirkt ist nicht klar. Für *ball* wäre eine gemeinsame Funktion im Rahmen des Zellzyklus vorstellbar.

Einen generellen Mechanismus zum Erhalt der Undifferenziertheit, Multipotenz und asymmetrischem Teilungsvermögen könnte die stammzellspezifische Transkriptionskontrolle durch Chromatinmodifizierung darstellen. Für *ball* als Histon-phosphorylierende Kinase wäre dabei eine Funktion bei der Gewährleistung eines Stammzell-typischen Transkriptionsprofils denkbar.

4 Material und Methoden

Wenn nicht anders beschrieben wurden molekularbiologische Standardmethoden nach Sambrook (Sambrook et al., 1989) angewandt.

4.1 Stammhaltung und Anzucht von Bakterien

Für eine kurzfristige Stammhaltung von mehreren Wochen wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten ausgestrichen, die das entsprechende Antibiotikum enthielten (Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml). Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Platten bei 4°C gelagert.

Die Anzucht benötigter Bakterien erfolgte durch Animpfen von Antibiotika-haltigem LB-Medium (Lurie-Bertani-Medium) mit Einzelkolonien. Die Kultur wurde bei 37°C über Nacht bei 225 Upm schüttelnd inkubiert.

Zur langfristigen Stammhaltung wurden 500 µl Bakterien-Übernachtskultur mit 500 µl sterilfiltrierter Glycerinlösung (65% (v/v) Glycerin; 0,1 M MgSO₄; 25 mM TrisHCl) vermischt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

Nährmedien für Bakterien

LB-Medium (1 l): 10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; pH 7,0

LB-Agar: 1 l LB-Medium; 15 g Agar-Agar

Die Bakterien-Medien sowie Agars wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und anschließend autoklaviert. Zur Herstellung der Agarplatten wurde LB-Agar aufgekocht und auf 45°C abgekühlt. Sterile Petrischalen (9 cm ø) wurden mit 20 ml flüssigem Agar gefüllt und bei RT bis zum Erstarren des Agars stehen gelassen. Nicht sofort verwendete Platten wurden bei 4°C aufbewahrt. Antibiotika wurden während des Abkühlens zum Medium gegeben.

Bakterienstämme

NovaBlue (Novagen, Schwalbach): *endA1 hsdR17*(r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) *supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F*⁺[*proA*⁺*B*⁺*lacI*^Δ*ZAM 15::Tn10*](Tet^R)

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden zunächst alle verwendeten sterilen Materialien auf 4°C gekühlt. 50 ml LB-Medium (siehe 4.1) wurde mit einer Einzelkultur des gewünschten Bakterienstammes angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 400 ml LB-Medium mit 10 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C inkubiert, bis das Bakterienwachstum eine optischen Dichte $OD_{600nm} = 0,3 - 0,5$ (siehe 4.2.2) erreicht hatte. Anschließend wurde die Kultur im Eisbad abgekühlt und in 50 ml Falconröhrchen aufgeteilt. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nach 12 minütiger Zentrifugation bei 5000 Upm wurden die entstandenen Pellets in je 16,5 ml eiskaltem RF1-Puffer aufgenommen. Nach 20 min Inkubation wurde erneut zu den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Pellets wurden in je 4 ml eiskaltem RF2-Puffer aufgenommen und für 15 min inkubiert. Die Suspension wurde in Aliquots zu je 100 µl aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

RF1: 100 mM RbCl; 50 mM MnCl₂; 30 mM Kac; 10 mM CaCl₂ x 2H₂O; 15% Glycerin; pH 5,8

RF2: 10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl₂ x 2H₂O; 15% Glycerin; pH 6,8

4.2.2 Präparation und Reinigung von DNA

Präparation genomischer DNA aus *D. melanogaster*

A.) Bis zu 30 Fliegen wurden in 500 µl DNA-Lyse-Puffer (siehe 4.5) in einem Eppendorfgefäß mit einem Eppli-Pistill homogenisiert. Zum Homogenat wurden 25 µl Proteinase K (5 mg/ml; Sigma, München) gegeben und 60 min bei 50°C inkubiert. Um die RNA zu entfernen wurden 1,5 µl RNase A (10 mg/ml; Sigma, München) zugegeben und 20 min bei 50°C inkubiert. Das Gemisch wurde mit Wasser auf 500 µl aufgefüllt. Es folgte eine zweimalige Phenolfällung (siehe weiter unten) mit je 500 µl Phenol-Chloroform. Die DNA wurde dann unter Zugabe von 1/10 Volumen 4 M LiCl und 400 µl Isopropanol gefällt (siehe 4.2.3). Das DNA-Pellet wurde mit 700 µl 70%igem EtOH gewaschen, anschließend in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 20 µl 10 mM TrisHCl pH 8,5 gelöst.

B.) Schnell-Präparation:

Einzelne Fliegen bzw. Larven wurden mit 50 µl Squishing-Puffer (siehe 4.5) homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 2,5 µl Proteinase K (5 mg/ml) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgte die Inaktivierung der Proteinase K bei 95°C für 2 min und ein Zentrifugationsschritt (Tischzentrifuge, 15000 Upm, 3 min). Die genomische DNA im Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Plasmid-DNA-Mini-/Midi-Präparation aus Bakterien

Plasmidpräparationen wurden von Bakterienflüssigkulturen mit dem Plasmidpräparationskits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl (Mini-Präparation) destilliertem und autoklaviertem Wasser von der Säule eluiert bzw. in 100 µl Wasser resuspendiert (Midi-Präparation).

Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Zu einer Nukleinsäurelösung wurde ein gleiches Volumen Phenol (Sigma, München) gegeben und für 10 min durch invertieren gemischt. Die Emulsion wurde zentrifugiert (Tischzentrifuge, 15000 Upm, 5 min), die wässrige Phase (oben) wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Das restliche Phenol wurde mit 500 µl Chloroform entfernt. Die obere wässrige Phase enthielt die von Proteinen gereinigte DNA.

4.2.3 DNA-Analyse und -BearbeitungAuftrennung von DNA-Fragmenten über Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wandern in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode. Die Laufgeschwindigkeit korreliert mit der Fragmentlänge; bei gleicher Länge zeigen linearisierte Fragmente gegenüber nicht linearisierten eine geringere Laufgeschwindigkeit (Ausubel et al., 1995). Zur Analyse und Präparation von DNA-Fragmenten wurden 1 - 2,5% Agarosegele verwendet (Sambrook et al., 1984). Die Gele wurden mit 0,5 x TBE hergestellt und enthielten 1 µg/ml Ethidiumbromid. Das Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert bei Durchstrahlung mit UV-Licht (Maniatis et al., 1984). Als Laufpuffer diente 0,5 x TBE (siehe 4.5). Die DNA-Proben wurden durch Zugabe von 10 x DNA-Aufragungspuffer (siehe 4.5) beschwert und zusammen mit einem DNA-Längenstandart (1 kbp DNA Ladder, Gibco,

Invitrogen, Karlsruhe) aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 100 V/ 25 mA und konnte unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 266 nm beobachtet werden.

Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen bzw. PCR-Ansätzen

Die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und PCR-Ansätzen erfolgte mithilfe der QIAquick-Säulen (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit 50 µl autoklaviertem, deionisiertem Wasser eluiert.

DNA-Präzipitation

Zu nukleinsäurehaltigen Lösungen wurden wahlweise 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 6,0) oder 4 M LiCl gegeben und gemischt. Die Fällung erfolgte dann unter Zugabe von 2-3 Volumen 100% igem EtOH oder 0,8 Volumen Isopropanol. Kleinere DNA-Fragmente (< 500 Bp) wurden nun für 30 min bei –20°C inkubiert. Die DNA war nach dem Zentrifugieren (15000 Upm, 25 min, RT) im Pellet enthalten. Das Pellet wurde mit 700 µl 70% igem EtOH gewaschen und zentrifugiert (15000 Upm, 5 min, RT). Das getrocknete Pellet (RT) wurde dann in einem für die Weiterverarbeitung geeigneten Puffer gelöst.

Photometrische DNA- bzw. Proteinkonzentrationsbestimmung

Nukleinsäuren besitzen für UV-Strahlen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, das zur Konzentrationsbestimmung DNA-haltiger Lösungen im Photometer verwendet wird. Bei einer Küvettenbreite von 1 cm lassen sich Konzentrationen mit Hilfe folgender Beziehungen berechnen:

Doppelsträngige DNA $c \text{ (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = 1\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Einzelsträngige DNA $c \text{ (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = 1\text{OD}_{260} \times 33 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Proteine absorbieren bei 280 nm, eine Verunreinigung der DNA kann daher mittels der Warburgschen Formel berechnet werden:

$$(1,45 \times \text{OD}_{280}) - (0,74 \times \text{OD}_{260}) = \text{mg Protein/ml}$$

Der Quotient OD_{260}/OD_{280} liegt bei einer sauberen DNA-Präparation bei 1,8. Gemessen wurde mit einem GeneQuant UV-Spektrometer (Pharmacia Biotech, Freiburg)

Behandlung der DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsnukleasen (Fermentas, St. Leon-Rot; NEB, Frankfurt am Main) wurden verwendet um DNA zu charakterisieren, zu isolieren oder zu linearisieren. Bei den verwendeten Enzymen handelt es sich um Endonukleasen, die DNA-Fragmente mit definierten Enden schaffen. Die eingesetzten Enzymkonzentrationen werden in Units (U) angegeben und richten sich nach der jeweiligen Enzymaktivität (1 Unit = Enzymmenge, die 1 μ g DNA in 1 h schneidet). Reaktionsansätze von analytischen Restriktionen enthielten in der Regel 0,5 μ g DNA und 1 U Enzym unter Beigabe des entsprechenden Puffers und wurden bei 37°C für 2 h durchgeführt. Präparative Restriktionsverdauungen wurden als Ligationsvorbereitung zur Herstellung komplementärer Überhangenden bei Vektor- und Insert-DNA mit 1-10 μ g DNA und 5 U Enzym bei 37°C über Nacht durchgeführt.

Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um nach der Linearisierung des Vektors eine Religierung zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatenden des Vektors mit dem Enzym Alkaline Phosphatase (SAP, Amersham Life Science, Freiburg) abgespalten. Im 50 μ l Reaktionsansatz war die Vektor-DNA und 1 Unit SAP in 1 x Reaktionspuffer enthalten. Die Dephosphorylierung erfolgte bei 37°C für 30 min. Anschließend wurde die Phosphatase bei 65°C für 20 min deaktiviert.

Ligation

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten in bestimmte Vektoren wurden dephosphorylierte Vektor-DNA und zu klonierendes Fragment im molaren Verhältniss 1:3 mit 1 U T4-DNA-Ligase (Roche, Mannheim) in einem 10 μ l Ligationsansatz mit 1 x Ligationspuffer (enthält dATP) über Nacht bei 6°C ligiert.

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR (englisch: **p**olymerase **c**hain **r**eaction) wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten genutzt (Ausubel et al., 1995). Hierbei wird die Matrizen-DNA denaturiert,

so dass sich Oligonucleotide ("Primer") komplementär an die DNA-Stränge anheften können, die wiederum als Erkennungspunkt zur Vervielfältigung der DNA-Stränge durch eine hitzestabile Polymerase benutzt werden. Die Primer wurden von der MWGBiotechAG (Ebersberg) hergestellt. Eine Liste der verwendeten Primer befindet sich unter 4.2.11. Die PCR-Reaktionen wurden in einem MultiCycler PTC-200 (Biozym, Hess. Oldendorf) durchgeführt.

Ein Standard-PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

| | |
|----------------------------|---------------------|
| 10x Puffer | 5 µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 4 µl |
| DNTPs (je 2,5 mM) | 2 µl |
| Primer A (10 µM) | 2 µl |
| Primer B (10 µM) | 2 µl |
| Taq-Polymerase (Fermentas) | 1 U |
| DNA | ca.10 ng |
| destilliertes Wasser | auf 50 µl auffüllen |

Folgendes Standard-Programm wurde verwendet:

1. 94°C 2 min
2. 94°C 30 sec
3. x °C Temperatur Primer-abhängig
4. 72°C Dauer Fragmentgrößen-abhängig
5. 72°C 10 min
6. 7°C 10 min

Anzahl der Zyklen (Schritte 2 bis 4): 25

PCR an genomischer DNA

Die Kandidatenlinien des Reversions-Screens (siehe 2.4.1) wurden mit den Oligonucleotiden PR, PF2 und P mittels genomischer PCR analysiert (Liste der Primer siehe 4.2.11). Der P-Primer bindet an DNA-Sequenzen am 5'- und am 3'-Ende des EP-Elements. Die Primer PR und PF2 lagern an genomische DNA-Sequenzen wenige hundert Basenpaare 5' bzw. 3' von der EP-Insertion entfernt an. Das Primerpaar PR/P ergibt ein 196 Basenpaare (Bp) großes Fragment auf *ball*¹-DNA, das Paar PF2/P ergibt eine 208 Bp große Sequenz. Das Primerpaar PR/PF2 amplifiziert ein 344 Bp großes Fragment auf Wildtyp-DNA.

Abweichend vom Standardreaktionsansatz wurden 0,3 µl genomische DNA (siehe 4.2.2) eingesetzt. Folgendes Programm wurde für die Primer PF2, PR und P verwendet:

1. 94°C 2 min
2. 94°C 30 sec
3. 60°C 30 sec
4. 72°C 30 sec
5. 72°C 10 min
6. 7°C 10 min

Anzahl der Zyklen (Schritte 2 bis 4): 30

Zur Amplifizierung des Bereichs der Defizienz in *ball*²-mutanten Individuen (siehe 2.4.3) wurde die Elongationszeit auf 1,5 min erhöht. Dazu wurden die Primer EP1 und Nterm3 verwendet.

Die erfolgreiche Rekombination von mutanten *ball*-Allelen und dem Nullallel des *Drosophila*-Gens *Dmp53* (*p53*^{5A-1-4}, Rong et al., 2002, siehe 4.4.4 und 2.6.4) auf dem III. Chromosom wurde durch genomische PCR bestätigt. Für den Nachweis der *ball*-Allele wurden wieder die Primer PR, PF2 und P eingesetzt. Die Rekombination von *p53*^{5A-1-4} wurde mit dem Primerpaar C2 und AH126 überprüft. Dieses Primerpaar liefert ein 1.5 kBp großes Fragment für das mutante Allel *p53*^{5A-1-4}. Auf Wildtyp-DNA amplifiziert das Primerpaar ein 4.5 kBp großes Fragment. Die PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

1. 94°C 2 min
2. 94°C 30 sec
3. 57°C 30 sec
4. 72°C 2 min
5. 72°C 10 min
6. 7°C 10 min

Anzahl der Zyklen (Schritte 2 bis 4): 30

Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al. (1977) durchgeführt. Bei der "Cycle-Sequenzierung" kommt es in einer Amplifizierungsreaktion beim statistischen Einbau von ddNTPs (Didesoxynukleotide) zum Abbruch der Kettensynthese. Einem Reaktionsansatz wurden die vier

unterschiedlich fluoreszenzmarkierten ddNTPs zugesetzt. Der Ansatz enthielt ferner die Matrizen-DNA, einen Primer und die hitzestabile DNA-Polymerase. In einem denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoffgel erfolgte die Auftrennung der Produkte dieser einseitigen Amplifizierungsreaktion. Die Sequenzierungen wurden von Gordon Dowe am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie (Göttingen) mit einem automatischen Sequenzierer (ABJ PRISM 377 DNA Sequencer, Applied Biosystems) durchgeführt. Die Insert-DNA der cDNA LD27410 (ResGen/Invitrogen, Karlsruhe) wurde mit den Primern T7 und SP6 (siehe 4.2.11) von beiden Seiten sequenziert. Der offene Leserahmen (ORL) von *ball* wurde nach der Klonierung in die UAS-Konstrukte (siehe 4.2.5) mit überlappenden Primern sequenziert.

Für eine Sequenzierungsreaktion wurden in Abhängigkeit von der Größe der DNA 500 ng Plasmid-DNA bzw. 100 ng PCR-Produkt zusammen mit 5 pmol des entsprechenden Primers mit Wasser auf ein Volumen von 12 µl gebracht.

Computer-Sequenz-Analysen

Die Analyse der DNA-Sequenzen erfolgte mit dem Programm Sequencher™ 3.1.1 und 4.1. (GeneCodes, MI, USA). Die weitere Computer gestützte Analyse der DNA- und Proteinsequenzen erfolgte mit Hilfe folgender Programme:

BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), WU-BLAST2 (<http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/>), InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>), Motif Scan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan/), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>), T-COFFEE (<http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html>).

4.2.4 Transformation von kompetenten *E. coli*

Die Ligationsansätze wurden in Zellen des Stammes NovaBlue (siehe 4.1) transformiert. Die bei –80°C gelagerten chemisch kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 2 µl des Ligationsansatzes (siehe 4.2.3) wurden mit 100 µl Zellsuspension vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Ein Hitzeschock für 30 sec im 42°C warmen Wasserbad bewirkte die Aufnahme der DNA über die Zellmembran. Nach der Abkühlung auf Eis für 2 min wurden 0,8 ml LB-Medium (siehe 4.1) zum Transformationsansatz gegeben und zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz für 45 min

bei 37°C und 225 Upm auf dem Schüttler inkubiert. 100 μ l dieses Ansatzes wurden direkt auf eine antibiotikahaltige LB-Agarplatte ausgestrichen. Weitere 50 μ l wurden nach vorheriger Zentrifugation (2 min bei 2000 Upm) ausplattiert. Die Platten wurden für 12 h bei 37°C inkubiert.

Für eine Blau-Weißselektion wurden die Agarplatten zuvor mit 80 μ l X-Gal (10% in DMF) und 40 μ l IPTG (100 mM; Biomol, Hamburg) behandelt.

4.2.5 Klonierung der UAS-Konstrukte

Zur ektopischen Expression von *ball* im UAS/GAL4-System (siehe 4.4.11) wurde der *ball*-OLR zusammen mit dem codierenden Bereich des Fluoreszenzproteins EGFP in den Vektor pUASP (siehe 4.2.9) kloniert. Dazu wurde der *ball*-OLR ohne Stopkodon von der cDNA LD27410 (ResGen/Invitrogen, Karlsruhe) mit den Primern CK15'NotI und CK13'BamHI amplifiziert (siehe 4.2.3 und 4.2.11). Über die Primer wurden die Restriktionsschnittstellen NotI (am 5'-Ende von *ball*) und BamHI (am 3'-Ende von *ball*) an die Insert-DNA angefügt. Über diese Schnittstellen wurde *ball* in den Vektor kloniert und transformiert. Der codierende Bereich von EGFP wurde aus dem Vektor pEGFP-N1 (Clontech, Heidelberg) mit den Primern EGFP5'BamHI und EGFP3'XbaI amplifiziert, wobei die Schnittstellen BamHI (am 5'-Ende) und XbaI (am 3'-Ende) angefügt wurden. Dieses Fragment wurde dann mit dem Vektor/*ball*-Fragment über die Schnittstellen BamHI und XbaI legiert (siehe 4.2.3), so dass die EGFP-Sequenz 3' vom *ball*-ORL in den Vektor inserierte. Das Klonierungsergebnis (UASP*ball*GFP, siehe 4.2.10) wurde durch Sequenzierung (siehe 4.2.2) überprüft und zur Herstellung transgener Fliegen genutzt (siehe 4.4.10).

4.2.6 Klonierung des Expressionskonstrukts

Die ersten 1056 Bp des *ball*-OLR wurden als PCR-Fragment (siehe 4.2.3) zwischen die EcoRI- und XhoI-Schnittstellen in den Expressionsvektor pGEX-4T-3 (siehe 4.2.9) kloniert. Die Schnittstellen der Insert-DNA wurden bei der PCR durch die Primer A2Ecocorr (EcoRI-Schnittstelle am 5'-Ende von *ball*) und Nterm3 (XhoI-Schnittstelle am 3'-Ende der *ball*-Sequenz) angefügt und das Ergebnis durch Sequenzierung (siehe 4.2.3) kontrolliert. Das entstandene Konstrukt (pGEX*ball*N, siehe 4.2.10)

exprimiert ein rekombinantes Fusionsprotein aus einem N-terminalen „GST-tag“ und den ersten 351 As von *ball* (beinhaltet den N-Terminus und die Kinasedomäne). Die Induktion wurde per Western-Blot-Analyse überprüft (siehe 4.2.12).

4.2.7 Herstellung von Digoxigenin (DIG) - und Fluoreszin (FLUO) -markierten RNA-Sonden

Zur Herstellung von RNA-Sonden wurde eine *in vitro*-Transkription mit einem RNA Labeling Kit (Roche, Mannheim) durchgeführt, bei der markierte Nukleotide (meist dUTP) beim Polymerisieren in den Strang eingebaut wurden. Die Startstellen für die RNA-Polymerase liegen im bakteriellen Vektor pOT2 auf beiden Seiten der multiblen Klonierungsstelle, in die das zu markierende DNA-Fragment eingesetzt wurde. So ist es möglich den Sense- bzw. Antisense-Strang der inserierten mRNA herzustellen. Bei einer *in situ*-Hybridisierung wird die Antisense-RNA-Sonde genutzt um die zu untersuchende mRNA zu detektieren, die Sense-Probe kann als Negativkontrolle genutzt werden.

Zur Herstellung der *ball*-Sonden wurde cDNA des Klons LD27410 (ResGen/Invitrogen, Karlsruhe) mit den Enzymen XhoI (für die Sense-Sonde) bzw. EcoRI (für die Antisense-Sonde) linearisiert (siehe 4.2.2). Die *ball*-cDNA ist so in den Vektor pOT2 inseriert, dass die SP6-Polymerase antisense-Probe herstellt, die T7-Polymerase dagegen die Sense-Probe ergibt. Die *in vitro*-Transkription erfolgte unter RNase-freien Bedingungen. Im Reaktionsansatz waren enthalten:

- 1 µg linearisierte DNA
- 1 µl 10x NTP-Markierungs-Mix
- 1 µl 10x Transkriptionspuffer
- 1 µl RNase-Inhibitor
- 1 µl RNA-Polymerase (SP6 bzw. T7)
- mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt

Der Reaktionsmix wurde 2 h bei 37°C inkubiert. Darauf folgte eine RNA-Reinigung (Rnaesy Mini Kit, Qiagen, Hilden). Die Proben wurden mit 30 µl RNase freiem Wasser eluiert, mit 70 µl Hybridisierungspuffer (siehe 4.3.3) verdünnt und bei -20°C gelagert.

4.2.8 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Die DNA-Sonden wurden mit dem *rediprime*TMII-Markierungssystem (Amersham-Pharmacia, Freiburg) hergestellt. In dieser Reaktion binden Zufallsprimer an verschiedene Stellen der Template-DNA. Diese Primer-DNA-Anlagerungen bilden das Substrat für das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I. Bei der DNA-Synthese werden dann Nukleotide durch radioaktiv markierte Nukleotide ausgetauscht. Als Template-DNA dienten PCR-Produkte (siehe 4.2.3), die mit folgenden Primern erhalten wurden: Sonde1: PR/P; Sonde2: PF2/P; Sonde3: CTerm2/A3; Sonde4: HisFOR/HisREV (siehe 4.2.11).

Die PCR-Produkte wurden bei 95°C für 5 min denaturiert und auf Eis abgekühlt. 50 ng DNA wurde mit 5 µl [32p] dCTP (3000 Ci/mmol) in ein *rediprime*TMII-Reaktionsröhrchen pipettiert und für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl 0,2 M EDTA gestoppt. Die markierte DNA wurde dann für 5 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt.

4.2.9 Vektoren

Für die Klonierungen wurden folgende Vektoren verwendet:

pBluescript KS⁺ (Stratagene Cloning Systems): 2958 Bp, Ampicillin-Resistenz, T3- und T7-Promotor

pOT2 (kloniert von OroonHubbard; <http://www.fruitfly.org/EST/pOT2avector.html>): ca. 1600 bp, Tetracyclin-Resistenz, Sp6- und T7-Promotor

PCRII-TOPO (Invitrogen): 3950 Bp, Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz, Sp6- und T7-Promotor. Aufgrund der α -Komplementationsfähigkeit wird bei Verwendung entsprechender Bakterienstämme eine Selektion auf β -Galaktosidaseaktivität ermöglicht.

pUASP (Rorth, 1998): 9500 Bp, Ampicillin-Resistenz, Expressionsvektor für GAL4-abhängige Expressionen

pGEX-4T-3 (Amersham-Pharmacia, Freiburg): 4950 Bp, Ampicillin-Resistenz, Expressionsvektor mit N-terminaler Glutathion-S-Transferase.

4.2.10 Liste der Plasmide

| Plasmidname | Schnittstellen | | Vektor | Insert-DNA |
|----------------|----------------|-----------------------|-----------|---------------------------------|
| | Vektor | Insert | | |
| pGEX $ball^N$ | EcoRI, XhoI | EcoRI, XhoI | pGEX-4T-3 | 1056 Bp des <i>ball</i> -ORL |
| LD27410 | | | pOT2 | <i>ball</i> -cDNA |
| UAS $ball$ GFP | NotI, XbaI | NotI, BamHI (1) | pUASP | (1) <i>ball</i> -ORL |
| | | BamHI, XbaI (2) | | (2) <i>EGFP</i> -ORL |

4.2.11 Liste der Primer

| Name | Sequenz 5'-3' | Verwendung |
|------------|---|--|
| T7 | AATACGACTCACTATAG | LD27410 |
| SP6 | GATTTAGGTGACACTATAG | |
| Plrev | CAGTTCATGCAGAAGCACGGTC | Klonierung und Sequenzierung von <i>ball</i> |
| P2 | CTGGACGTCTATCAGTACATG | |
| P1 | GACCGTGCTTCTGCATGAACTG | |
| CK15NotI | AAAAGCGGCCGCAATGCCGCGTGTAGCCAAGCCGAAAAG | |
| CK13BamH1 | AAAAGGATCCTCCCTGGTATTTCCGCACAGTGACG | |
| Cterm5rev | TGGCTGTCTTCTTGCGATGTGACT | |
| CK1C3eco | AAAAGAATTCTCCCTGGTATTTCCGCACAG | |
| CK1C5 | AAAAGAATTCTCTAAGTCCGCCCGGCACGAGCAAGG | |
| A3 | GTCCTATCCCTGGTATTTCCGCAC | |
| CK3rev | GTCAGTGTGCGGAAATACCAGG | |
| CK15not | AAAAGCGGCCGACCGCGTGTAGCCAAGCCGAAAGCC | |
| CK13BamH1 | AAAAGGATCCTCCCTGGTATTTCCGCACAGTGACG | |
| EGFP5BamH1 | AAAAGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG | |
| EGFP3xbaI | AAAATCTAGACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG | |
| GFP5rev | CTTCAGGGTCAGCTTGCCGTA | |
| GFP3rev | GTCCTGCTGGAGTTCGTGAC | |
| A2Ecocorr | AAAAGAATTCGAGAATGCCGCGTGTAGCC | |
| Cterm2 | CCAGTCTTGAATTCATCACTGGACG | |
| C2 | TCGATAAACATTGGCTACGGCGATTGT | PCR $p53^{5A-1-4}$ |
| AH126 | CTCGTTGGACGAGCGCACAG | |
| EP1 | GGTCGAGGAGCTGGCGCAG | Sequenzierung $ball^2$ |
| Nterm3 | AAAACGAGGCTGGTCTGTGGCTTCATCTTAAAGTC | |
| PR | TGACTCGGCAAACAGCCCTGGC | Nachweis der EP863-Insertion |
| PF2 | GCGCCACTGGCCTTGGCTAAATCGG | |
| P | CGACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCATG | |
| HisFOR | GCACGCTCCGGTTTCGTG | PCR <i>His2Av</i> |
| HisREV | CACGGCTGCAGTGGCTC | |

4.2.12 Western Blot Analyse

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteinproben wurden in 2 x SDS-Probenpuffer (siehe 4.5) durch aufkochen denaturiert und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Proteine über eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurde zunächst ein 10%iges Trenngel (siehe 4.5) in eine Minigelkammer gegossen und nach dem Auspolymerisieren mit 1 ml Sammelgel (siehe 4.5) überschichtet. Die Elektrophorese wurde in einem Minigelkammersystem (BioRad, München) bei einer konstanten Spannung von 120 V durchgeführt. Als Laufpuffer diente 1 x SDS-Puffer (siehe 4.5).

Coomassiefärbung

Die Auftrennung der Proteine im Gel konnte anschließend durch eine Coomassiefärbung sichtbar gemacht werden. Dazu wurden die Gele in Coomassielösung (siehe 4.5) gefärbt und anschließend durch mehrfaches Waschen mit Proteingelfixierpuffer (siehe 4.5) entfärbt.

Western Blot

Der Nachweis der spezifischer Proteine erfolgte über eine Western-Blot-Analyse.

Dazu werden die Proteine in einem vertikal zur Geloberfläche angelegten elektrischen Feld aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (Amersham Bioscience, Freiburg) übertragen. Der Transfer fand in Laemmli-Blot-Puffer (siehe 4.5) bei einer konstanten Stromstärke von 0.15 A pro Gel für 1 h in einem gekühlten Blottingkammersystem (BioRad, München) statt.

Alle folgenden Waschschritte und Inkubationen wurden in 5% Magermilch in PBS (siehe 4.5) durchgeführt. Unspezifische Bindungsstellen für Antikörper auf der Membran wurden in 5% Magermilch in PBS blockiert.

Am zweiten Tag wurde der Blot für 2 h mit dem Primärantikörper (siehe 4.3.5) inkubiert. Nach gründlichem Waschen folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (siehe 4.3.5) für 30 min, gefolgt von 5 maligem Waschen. Zuletzt wurde noch 2 x mit PBS gespült. Der Nachweis des Antikörpers erfolgte

autoradiographisch über eine Chemilumineszenz-Detektion (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, Perbio Science, Bonn).

4.2.13 Southern Blot Analyse

Präparation und Verdau der Gesamt-DNA

Pro Spur wurde die genomische DNA von 4 männlichen Fliegen in 250 µl Lysispuffer präpariert (siehe 4.2.2). Das DNA-Pellet wurde in 20 µl Wasser gelöst und mit 1,5 µl des entsprechenden Enzyms (siehe 2.4.2) über Nacht verdaut. Die DNA wurde nach der Inaktivierung der Enzyme (bei 65°C für 20 min) in einem 0,8% igen Agarosegel für 6 h bei 70 V aufgetrennt. Zusätzlich wurden 3 µg DNA-Standard aufgetragen.

Southern-Blot-Transfer

Das Agarose-Gel wurde kurz in Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) aequilibriert, bevor die DNA in einem aufwärts gerichteten Kapillarblot (Ausubel, 1995) auf eine Nylon-Membran (HybondTM-N⁺, Amersham-Pharmacia, Freiburg) transferiert wurde. Als Laufpuffer diente Denaturierungspuffer, das Blotten wurde über Nacht durchgeführt. Die Membran wurde dann für je 10 min mit Denaturierungspuffer, mit Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl; 1 M Tris/HCl pH 7,5) und abschließend mit 2 x SSC (siehe 4.5) gewaschen. Anschließend wurde die DNA mittels UV-Licht (1.2 kJ/cm²) kovalent an die Membran gebunden.

Hybridisierung

Die Hybridisierung der genomischen DNA auf der Nylonmembran mit der radioaktiv markierten DNA-Sonde erfolgte in einem Hybridisierungssofen (HYBAID^{T0} MWG Biotech), in dem die Hybridisierungsröhren bei 65°C gleichmäßig gedreht wurden. Zunächst wurde die Membran in 5 ml Hybridisierungspuffer Rapid-hyb (Amersham-Pharmacia, Freiburg) für 1,5 h Stunden prähybridisiert. Dann wurden 25 µl denaturierte radioaktiv markierte DNA-Sonde dazugegeben und für weitere 1,5 h hybridisiert. Der Blot wurde anschließend 2 x 2 min mit Waschpuffer I (2 x SSC) bei RT gespült und für 1 h mit Waschpuffer II (0,2 x SSC; 0,1 x SDS) bei 65°C gewaschen. Anschließend wurde die Membran in Folie eingeschweißt.

Detektion radioaktiv markierter Sonden

Die eingeschweißte Membran wurde in eine Autoradiographiekassette überführt und nach Auflegen eines Röntgenfilmes bei -80°C je nach Signalstärke der Sonde für einige Stunden bis einige Tage inkubiert. Anschliessend wurde der Film in einer Entwicklermaschine (Optimax TR, PROTEC Medizintechnik, Osterfeld) entwickelt.

4.2.14 Expression und Reinigung rekombinanter Proteine

Expression rekombinanter Proteine

E. coli des Stammes NovaBlue (siehe 4.1) wurden mit dem Expressionskonstrukt pGEXballN transformiert (siehe 4.2.4) und auf Ampicillin-haltigen LB-Platten ausplattiert (siehe 4.1). Einzelkolonien wurden dann zum Animpfen von 50 ml LB-Ampicillin-Vorkultur verwendet (Wachstum ÜN, siehe 4.1). Die Vorkultur wurde zum Animpfen (1:200) einer 3 l LB-Ampicillin-Kultur verwendet. Hatte die Bakterienkultur eine optische Dichte von OD_{600} 0,4 erreicht, wurde die Produktion des rekombinanten Proteins durch Zusatz von 0,4 mM IPTG (Biomol, Hamburg) für 2 h bei 30°C induziert. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugieren ($4000 \times g$, 15 min, 4°C) geerntet und mit eiskaltem PBS (siehe 4.5) gewaschen. Die Zellen wurden nochmals abzentrifugiert ($4000 \times g$, 10 min, 4°C) und das Pellet bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gefroren. Die Induktion wurde mittels Western Blot Analyse kontrolliert (siehe 4.2.12).

Präparation des Zellextrakts

Die folgende Präparation von Gesamtprotein wurde bei 4°C und Zusatz eines Protease-Inhibitor-Cocktails (Complete, Roche, Mannheim: 1 Tablette/ 25 ml Puffer) in allen Puffern durchgeführt. Die Zellen wurden in 20 ml/l Kulturvolumen HEMG1-Puffer (0,5 M NaCl; 0,1% NP-40; in HEMG-Puffer) resuspendiert und unter Zusatz von Lysozym (0,25 mg/ml) 30 min inkubiert. Ein weiterer Aufschluss der Zellen erfolgte durch 3 Gefrier- und Auftauzyklen und Sonifizierung (3 x 10 s, Branson Sonifier 250). Unlösliche Zellbestandteile wurden abzentrifugiert.

HEMG-Puffer: 25 mM Hepes pH 7,6; 0,1 mM EDTA pH 8,0; 12,5 mM MgCl_2 ; 10% Glycerol

Reinigung rekombinanter Proteine

Die Präparation des GSTBallN-Fusionsproteins (siehe 4.2.5 und 4.2.10) aus den Zellextrakten erfolgte entsprechend dem Protokoll des Herstellers des verwendeten Glutathion-Agarose-Materials (Glutathion-Sepharose4B, Amersham-Pharmacia, Freiburg) bei 4°C unter Zusatz von Protease-Inhibitoren (Complete, Roche, 1 Tablette/ 25 ml Puffer). Der proteinhaltige Überstand wurde mit in HEMG1-Puffer äquilibriertem Glutathion-Agarose-Material (1 ml/ 1 l Kulturvolumen) 30 min inkubiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das GST-Fusionsprotein-bindende Material je 5 x mit HEMG1 und HEMG2 (0,5 M NaCl; 0,01% NP-40; in HEMG-Puffer) gewaschen. Das GSTBallN-Fusionsprotein wurde anschließend durch eine 45 minütige Inkubation mit Elutionspuffer (15 mM reduziertes Glutathion in HEMG2; pH 7,6) im Verhältnis 1,5 ml pro 0,5 ml Glutathion-Agarose von der Glutathion-Agarose gewaschen. Die Elution wurde wiederholt, die Eluate anschließend vereinigt, konzentriert und in PBS umgepuffert (Vivaspin Ultrafiltrationsröhrchen; Vivascience, Hannover).

4.2.15 Herstellung von anti-Ball-Antikörpern

Zum Nachweis der *ball*-Expression wurden polyklonale Antikörper gegen Bällchen hergestellt. Dazu wurde rekombinantes *ball*-Protein (GSTBallN-Fusionsprotein, siehe 4.2.6) wie in 4.2.14 beschrieben hergestellt und aufgereinigt. Die Immunisierungen wurden in der Abteilung Neurobiologie hier im Hause durchgeführt. Für die Immunisierung wurden einmalig je 300 µg rekombinantes Protein in zwei Kaninchen injiziert. Die Immunisierungen wurden 7 x in vierwöchigem Abstand mit jeweils 200 µg Protein pro Kaninchen wiederholt. Die Antiseren wurden nach Standardmethoden Affinitäts-gereinigt (M. Warnefors und A. Herzig, unpublizierte Daten) und dann in einer Verdünnung von 1:400 in Gewebefärbungen eingesetzt.

4.3 Histologie

Die Präparation, Fixierung und Färbung von Geweben und Embryonen wurden, wenn nicht anders beschrieben, nach Standardmethoden (Ashburner, 1989) durchgeführt.

4.3.1 Fixierung von Geweben zur *in situ*-Hybridisierung

Embryonen wurden mit Embryo-Waschpuffer (0,7% NaCl; 0,1% Triton) von den Ablageplatten auf kleine Netze transferiert. Die Embryonen wurden dann für 3 min mit 50% Klorix dechorionisiert, anschließend mit Embryo-Waschpuffer gründlich gespült. Die Fixierung erfolgte in 500 µl PBT (siehe 4.5), 500 µl RNA-Fixans (10% Paraformaldehyd in PBS; 50 mM EGTA; pH 7,0) und 5 ml Heptan unter starkem Schütteln für 20 min bei RT. Die fixierten Embryonen befanden sich dann in der Interphase. Das Fixans wurde abgezogen. Zur Entfernung der Vitellinmembran wurden die Embryonen in einem Heptan/Methanol-Gemisch (1:1) für eine Minute kräftig geschüttelt. Devitellinisierte Embryonen sanken zu Boden, wurden dann mehrfach mit Methanol gewaschen und im Anschluss bei –20°C in Methanol gelagert.

Larvale und adulte Gewebe wurden nach vorhergehender Präparation ebenfalls für 20 min in PBT/RNA-Fixans (1:1) fixiert und anschließend mehrfach mit PBT gewaschen.

4.3.2 Fixierung von Geweben zur Antikörperfärbung

Embryonen wurden wie für *in situ*-Hybridisierungen fixiert. Übrige Gewebe wurden zunächst in PBS präpariert (max 10 min). Larvale Gonaden und adulte Testis wurden für 20 min in Fixierpuffer B (4% PFA in PBS; pH 7,0) fixiert, dann mehrmals mit PBT gewaschen und für 20 min mit Permeabilisierungspuffer (1% TritonX100; 0,1% Tween 20 in PBS) bei leichter Bewegung inkubiert. Es folgten zwei Waschungen mit PBT für je 10 min.

4.3.3 *in situ*-Hybridisierung

Fixierte Gewebe wurden gegebenenfalls in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert, in PBT überführt und für 20 min nachfixiert (PBT/RNA-Fixans 1:1). Nach mehrmaligem Waschen mit PBT folgte ein Verdau mit 10 µl Proteinase K (5 mg/ml; Sigma, München) in 1 ml PBT für 2 min (Embryos und larvale Gewebe) bzw. 25 min (adulte Gonaden). Die Proben wurden anschließend 4 x mit PBT gespült und nochmals für 20 min nachfixiert (PBT/RNA-Fixans 1:1). Anschließend folgten fünf Waschschrte von je fünf Minuten in PBT, gefolgt von jeweils 15 minütigen Inkubationen in

PBT/Hybridisierungspuffer I (50% Formamid deionisiert; 5 x SSC) im Verhältnis 1:1, in *in situ*-Hybridisierungspuffer I und dann in Hybridisierungspuffer II (50% Formamid deionisiert; 5 x SSC; 200 µg/ml sonifizierte, denaturierte, phenolisierte Heringssperma-DNA; 100 µg/ml tRNA; 50 µg/ml Heparin; pH 5,0). Anschließend wurden die Gewebe für 20 min bei 55°C in Hybridisierungspuffer II prähybridisiert. Die Hybridisierung mit der RNA-Sonde (1,5 µl in 60 µl Hybridisierungspuffer II) erfolgte erst für 5 min bei 80°C, dann über Nacht bei 55°C. Am nächsten Morgen wurden vier Waschschritte von je 20 Minuten Dauer bei 60°C durchgeführt, einmal davon mit Hybridisierungspuffer II, dann zweimal mit Hybridisierungspuffer I. Anschließend wurde die gleiche Mengen PBT zugegeben und nach dem Absetzen der Proben mehrfach bei RT mit PBT gewaschen. Die Sekundärantikörper (anti-DIG-AP Fab Fragmente, siehe 4.3.5) wurden an fixierten Embryonen für 1 h präabsorbiert, bevor sie für 1 h bei RT auf die Proben gegeben wurden. Danach folgten vier Waschschritte für je 20 min in PBT. Zur Detektion der markierten RNA-Sonden wurden die Proben in *in situ*-Färbepuffer I (100 mM Tris/HCl; pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂; 0,1% Tween 20) überführt. Die Farbreaktion fand in 1 ml *in situ*-Färbepuffer unter Zugabe von 3,5 µl BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate; Roche, Mannheim) und 4,5 µl NBT (4-Nitro blue tetrazolium chloride; Roche, Mannheim) statt. Je nach Sonde und Häufigkeit sowie Verteilung des nachzuweisenden Transkripts war eine spezifische Färbung nach mehreren Minuten bis Stunden zu sehen. Die Farbreaktion wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBT gestoppt und die Proben in einer aufsteigenden EtOH-Reihe entwässert (EtOH: 25%, 50%, 70%, 90%, 2x 100%, jeweils 5 min).

Für Doppelfärbungen wurden die Proben rehydriert, für 10 min mit Glycin-Puffer (100 mM; pH 2,2) inkubiert, mehrfach mit PBT gewaschen und für 1 h mit präabsorbierten Sekundärantikörpern (anti-FITC-AP, siehe 4.3.5) inkubiert. Nach gründlichem Waschen mit PBT folgte die Detektion in 1 ml *in situ*-Färbepuffer II (100 mM Tris/HCl; pH 8,2; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂; 0,1% Tween 20) mit 2,5 µl Fast-Red (Sigma, München; 100 mg/ml in DMF) und 10 µl NABP (Sigma, München; 50 mg/ml in DMSO). Die Reaktion wurde durch häufiges Waschen mit PBT gestoppt. Die Proben wurden auf Objektträgern in 30% Glycerol in PBS eingebettet. Entwässerte Proben wurden in Benzylalkohol/Benzylbenzoat (1:2) eingebettet.

4.3.4 Antikörperinkubation und Detektion

Antikörperinkubation

In Methanol gelagerte Embryonen wurden zuvor in einer absteigenden Methanolreihe rehydriert. Die fixierten Gewebe wurden 3 x 5 min in PBT gewaschen und anschließend für 30 min in 5% normalisiertem Pferdeserum (NHS) in PBT präabsorbiert. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte in individueller Verdünnung (siehe 4.3.5) in 5% NHS in PBT bei 4°C über Nacht.

Am zweiten Tag wurden die Gewebe 2 x kurz und 3 x 20 min mit PBT gewaschen. Die letzten beiden Waschschrte enthielten je 5% NHS. Die Sekundärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:10 für mindestens 1 h in 5% NHS in PBT an fixierten Embryonen präabsorbiert. Die präabsorbierten Antikörper wurden für 2 h bei RT in individueller Endverdünnung in PBT mit 5% NHS mit den Geweben inkubiert. Anschließend folgten 3 kurze und 4 längere (je 10 min) Waschschrte mit PBT.

Für DNA-Färbungen wurden die Präparate am Ende der Antikörperfärbungen für 30 min mit RNaseA (10 mg/ml; Sigma, München) in PBT in einer 1:10 Verdünnung inkubiert. Der RNase-Verdau wurde durch zweimaliges Waschen mit PBT für je 5 min gestoppt. Die DNA wurde dann für 10 min mit Propodium Iodide (1 mg/ml; Molecular Probes, Invitrogen; Karlsruhe) 1:500 verdünnt in PBT gefärbt, anschließend wurde kurz in PBS gespült und die Präparate, wie weiter unten beschrieben, eingebettet.

Detektion biotinylierter Sekundärantikörper

In einer 30 minütigen Inkubation von Avidin DH und biotinylierter Meerrettich-Peroxidase (Vectastain-ABC-Kit; Vector-Laboratories Burlingame, USA) wurde ein Avidin-biotinylierte Peroxidase-Komplex gebildet und für 30 min bei RT zu den Geweben gegeben. Nichtgebundene Komplexe wurden durch 4 x 15 min Waschen mit PBT entfernt. Für die Peroxidasefärbung wurden 20 µl DAB (10 mg/ml) mit 5 µl H₂O₂ (30% H₂O₂ 1:100 frisch verdünnt) in 500 µl PBT gemischt und zu den Geweben gegeben. Die Färbereaktion wurde durch gründliches Waschen mit PBT gestoppt.

Detektion von Alkalischer Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörpern

Die Alkalische Phosphatase-Reaktion wurde wie unter 4.3.3 beschrieben durchgeführt und durch mehrfaches Waschen mit PBT gestoppt.

Einbettung:

Die Antikörperfärbungen wurden in 80% Glycerol, in Mowiol (siehe 4.5) oder nach langsamer Überführung in 100% EtOH in Benzylalkohol/Benzylbenzoat (1:2) eingebettet.

Antikörperfärbungen an *ball*-Embryonen

Zur Färbung des embryonalen Nervensystems und der Keimzellen (siehe 2.5.2) wurden Doppelfärbungen durchgeführt. Das verwendete Balancierchromosom (siehe 4.4.4, Linie Nr. 2) exprimiert das β -Galaktosidase (β -Gal) codierende *LacZ*-Gen im Expressionsmuster des Gens *ultrabithorax (ubx)* bzw. *fushi-tarazu (ftz)* im Embryo. Der Nachweis der β -Gal-Aktivität mit Antikörpern aus Kaninchen (siehe 4.3.5) ermöglichte die Unterscheidung von homozygoten und heterozygoten Tieren. Die Sekundärantikörper waren mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt (siehe 4.3.5). Für die Nervensystemfärbungen wurden die Mausantikörper mAb22C10 (Fujita et al., 1982) verwendet, die zugehörigen Sekundärantikörper waren biotinyliert (siehe 4.3.5). Für die Keimzellzählung in *ball*²-Embryonen wurden anti-Vasa-Antikörper aus Kaninchen (A. Herzig, siehe 4.3.5) verwendet. Die Detektion erfolgte mit biotinylierten Sekundärantikörpern. Im Anschluss an die Antikörperinkubationen folgte die Peroxidasefärbung vor der Alkalischen Phosphatase-Färbung.

Für die Bestimmung der Keimzellzahlen in transheterozygoten Embryonen (siehe 2.5.2) wurden Doppelfärbungen mit anti-LacZ-Antikörpern (siehe 4.3.5) und den anti-Vasa-Antikörpern (A. Herzig, siehe 4.3.5) durchgeführt. Beide Kaninchenantikörper wurden mit dem gleichen Alkalische Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert.

Mikroskopie und Photographie

Alle lichtmikroskopischen Beobachtungen und Photographien wurden mit einem Zeiss Axiophot-Mikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen) mit angeschlossener Kontron Progress 3012-CCD-Kamera (Jenoptik, Jena) vorgenommen. Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen erfolgten mit einem Leica TCS SP2-Konfokalmikroskop (Bensheim). Für die Weiterbearbeitung der digitalen Fotografien wurde das Programm Photoshop 5 (AdobeSystems, San Jose, CA, USA) verwendet.

Testisquetschpräparation

Adulte Testes wurden in PBS präpariert und in PBS auf einen Objektträger überführt. Die Testis wurden dann durch leichten Druck auf das Deckgläschen gequetscht. Die austretenden Spermatogenesestadien wurden im Phasenkontrastlicht unter dem Mikroskop beobachtet.

4.3.5 Liste der verwendeten Antikörper

Primärantikörper

| Name | Antigen | Herkunft | Verdünnung | Referenz |
|---------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------|--|
| mAb7G10 | Fasciclin III | Maus (monoclonal) | 1:10 | DSHB, Iowa City, IA, USA |
| mAb1B1 | Hts | Maus (monoclonal) | 1:5 | DSHB, Iowa City, IA, USA |
| anti-FITC-AP | Fluorescein-thioisocyanate | Schaf | 1:2000 | Boehringer/Roche, Mannheim |
| mAb22C10 | Futsch | Maus (monoclonal) | 1:100 | S. Benzer DSHB Iowa City, IA, USA, |
| anti-LacZ | β -Galactosidase | Kaninchen (polyclonal) | 1:2000 | Cappel, ICN, Eschwege |
| A11122 | GFP | Kaninchen (polyclonal) | 1:500 | Molecular Probes, Eugene, OR, USA |
| anti-DIG-AP Fab fragments | DIG | | 1:1000 | Roche, Mannheim |
| anti-Vasa | Vasa | Kaninchen (polyclonal) | 1:1000 | A. Herzig |
| anti-Ball | Bällchen | Kaninchen (polyclonal) | 1:400 | diese Arbeit |
| Anti-NHK | Bällchen | Kaninchen | 1:250 | Aihara et al. 2004 |
| mAb5A1 | Aktivierte Caspase-3 | Kaninchen (monoclonal) | 1:1500 | Cell Signaling Technology, Beverly, MA |

Sekundärantikörper

| Name | Markierung | Herkunft | Verdünnung | Referenz |
|----------------|------------------------|-----------|------------|-----------------------------------|
| anti-Kaninchen | Alexa 488 | Ziege | 1:500 | Molecular Probes, Eugene, OR, USA |
| anti-Kaninchen | Biotin | Ziege | 1:500 | Vector Labs, Burlingame, CA, USA |
| anti-Kaninchen | Alkalische Phosphatase | Ziege | 1:500 | Dianova, Hamburg |
| anti-Maus | Alexa 568 | Ziege | 1:500 | Molecular Probes, Eugene, OR, USA |
| anti-Maus | Biotin | Pferd | 1:500 | Vector Labs, Burlingame, CA, USA |
| anti-Ratte | Biotin | Kaninchen | 1:500 | Vector Labs, Burlingame, CA, USA |

4.4 Embryologie und Genetik

Die Haltung der Fliegenstämme und Kreuzungen erfolgte nach Standardmethoden (Roberts, 1986; Ashburner, 1989; Greenspan, 1997).

4.4.1 Stammhaltung und Anzucht von *Drosophila melanogaster*

Die Fliegenzucht erfolgte in Plastikröhrchen unterschiedlicher Größe, die einige cm hoch mit Maisgriesagar (60% Maisgries; 7,15% Fructose; 1,2% Trockenhefe; 0,14% Nipagin; 0,6% Propionsäure; 0,7% Agar) gefüllt wurden. Die Röhrchen wurden mit Wattestopfen verschlossen. Die Stammhaltung erfolgte bei 18°C bzw. 22°C. Kreuzungen und Amplifizierungen und Embryoablagen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 22°C durchgeführt. Zum Ansetzen von Kreuzungen bzw. zur Auswahl bestimmter Individuen wurden die Fliegen kurzfristig mit CO₂ betäubt.

Für die Fertilitätstests wurden Fliegen in Einzelkreuzungen mit Jungfrauen bzw. Männchen eines Wildtypstammes zusammengesetzt und so über mehrere Tage zur Ablage angeregt.

4.4.2 Embryokollektionen

Die Ablage der Eier von Fliegen, deren Nachkommenschaft embryologisch untersucht werden sollte, erfolgte bei Fütterung mit Hefe auf Apfelsaftagar-Platten (25% Apfelsaft; 1,25% Saccharose; 2,5% Trockenhefe; 0,2% Nipagin; 2,7% Agar). Die Gelege wurden zu geeigneten Zeitpunkten, typischerweise 16 h nach dem abendlichen Beginn der Ablage mit dem Pinsel abgesammelt und fixiert (siehe 4.3.1 und 4.3.2). Für die Expressionstests im GAL4/UAS-System (siehe 4.4.11) wurden 0-4 h Ablagen für weitere 2-4 h bei 29°C inkubiert.

4.4.3 Larvenkollektionen

Zur Unterscheidung von homozygoten und heterozygoten Larven wurden *ball*-Allele mit Balanzierchromosomen verkreuzt, die während der gesamten Entwicklung das Green Fluorescent Protein (GFP) exprimieren (siehe 4.4.4, Linie Nr. 4). Homozygote und heterozygote Tiere konnten so unter dem Fluoreszenzbinokular (Leica MZ FLIII, Bensheim) voneinander unterschieden werden. Die Fliegen wurden in mittleren Fliegenröhrchen für mehrere Stunden zur Ablage gebracht und dann entfernt. Die Larven entwickelten sich unter Zugabe von gelöster Bäckerhefe zum Futter bei 22°C. Dabei wurde auf eine geringe Besiedlungsdichte in den Röhrchen geachtet, um ein gleichmäßiges Wachstum der Larven zu gewährleisten. Für die Präparation wurden Larven gleichen Entwicklungsstadiums gewählt. Das heißt, es wurden Larven gewählt, die bereits aus dem Futter herausgekrochen waren und daher kurz vor der Verpuppung standen (wandernde dritte Larven). Ein weiteres Auswahlkriterium zur Gewährleistung eines einheitlichen Entwicklungsstadiums war eine einheitliche Larvengröße und Ausprägung des Fettkörpers von mutanten Larven und Kontrolllarven.

Bestimmung der letalen Phase und der Entwicklungsverzögerung in den mutanten *ball*-Allelen

Alle Durchführungen erfolgten bei 22°C. Zur Unterscheidung von homozygoten und heterozygoten Larven wurde ein Balanzierchromosom verwendet, welches das Fluoreszenzprotein GFP ubiquitär exprimiert. Zur Bestimmung der letalen Phase (siehe 2.5.1) wurden 100 Eier einer 0-4 h Ablage der balanzierten *ball*²-Linie, der

homozygoten *ball^{rev}*-Linie und die Ablage einer Kreuzung aus balanzierten *ball²*-Jungfrauen mit Männchen der balanzierten Defizienzlinie auf Apfelsaftagarplatten unter Zugabe von Hefe transferiert (Fliegenlinien Nr. 8, 30, 31; siehe 4.4.4). 29-33 h nach der Eiablage wurden die geschlüpfen Larven und die nicht geschlüpfen Embryonen gezählt.

Zur Bestimmung der Entwicklungsdauer wurden je 100 Larven, die homozygot für ein *ball*-Allel bzw. *ball²*/Defizienz waren, nach dem Schlüpfen in mittlere Fliegenröhrchen gesetzt, bis zur Puppenbildung unter Zugabe von Bäckerhefe inkubiert und die Zahl der Verpuppungen bestimmt.

4.4.4 Liste der verwendeten Fliegenlinien

| Nr. | Genotyp | Herkunft |
|-----|---|----------|
| 1 | w ⁺ ; TM3, Sb e/ TM6, Antp ^{Hu} e Tb | (g) |
| 2 | w ⁺ ; D/ TM3, P{Ubx-lacZ} Sb e | (g) |
| 3 | y ¹ w ⁺ ; wg ^{Sp-1} / Cy, P{ftz-lacZ}; Dr*/ TM3 P{ftz-lacZ}, Sb e | (g) |
| 4 | y ¹ w ⁺ ; wg ^{Sp-1} / Cy, P{ActGFP}JMR1; Dr*/ TM3 P{ActGFP}JMR1, Ser e | (g) |
| 8 | Df(3R)Tl-I, e/ TM3 P{ActGFP}JMR1, Ser e | (g) |
| 9 | w ⁺ | (g) |
| 10 | w ⁺ ; P{EP}EP0863/ TM3, Sb e | (b) |
| 11 | y ¹ w ⁺ ; P{neoFRT}82B Sb/ TM6, e Antp ^{Hu} | (g) |
| 12 | w ⁺ ; P{neoFRT}82B P{ovoD1-18}3R/ st betaTub85D ss e ^s / TM3, Sb e | (g) |
| 13 | P{hsFLP}1, y w ^{T118} ; Dr ^{Mio} / TM3, ry* Sb e | (g) |
| 14 | w ⁺ ; l(3)810/ TM6B, Antp ^{Hu} Tb e | (a) |
| 15 | w ⁺ ; p53 ^{5A-1-4} | (g) |
| 16 | w ⁺ ; P{vasaGFP}; Pr Dr*/ TM3, Sb e | (c) |
| 17 | y ⁺ w ⁺ ; P{en-lacZ ²⁵⁴ }esg 35C/ Cy | (d) |
| 18 | y ⁺ w ⁺ ; P{lacZ ⁶⁰⁰ }28C | (d) |
| 19 | y ¹ w ⁺ ; P{en2.4-GAL4}e 22c/ SM5 | (g) |
| 20 | y ¹ w ⁺ ; P{Act5C-GAL4}25FO1 | (g) |
| 21 | w ⁺ ; P{GAL4-nos.NGT}40 | (g) |
| 22 | w ⁺ ; P{UAS-ballGFP} | (e) |
| 23 | w ⁺ ; P{EP}ball ¹ / TM3, Sb e | (e) |
| 24 | w ⁺ ; P{EP}ball ¹ , e ru/ TM3, Sb e | (e) |
| 25 | w ⁺ ; ru st e ca | (g) |
| 26 | y w ⁺ ; Cy, H{Pdelta2-3}HoP2.1/ Bc Egr ^{E1} | (g) |
| 27 | w ⁺ ; P{EP}ball ¹ , e ru/ TM3, P{Ubx-lacZ} Sb e | (e) |
| 28 | y w ⁺ ; P{EP}ball ¹ , e ru/ TM3 P{ftz-lacZ}, Sb e | (e) |
| 29 | y w ⁺ ; P{EP}ball ¹ , e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e | (e) |
| 30 | y w ⁺ ; ball ^{rev} , e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e | (e) |
| 31 | y w ⁺ ; ball ² , e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e | (e) |
| 32 | y w ⁺ ; ball ³ , e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e | (e) |
| 33 | w ⁺ ; P{vasaGFP}; P{EP}ball ¹ , e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e | (c,e) |
| 34 | y w ⁺ ; P{en-lacZ ²⁵⁴ }esg/ Cy, P{ftz-lacZ}; P{EP}ball ¹ , e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e | (d,e) |

| Nr. | Genotyp | Herkunft |
|-----|--|----------|
| 35 | y w [*] ; P{lacZ ⁶⁰⁰ }; P{EP863}ball ¹ e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e | (d,e) |
| 36 | w [*] ; P{vasaGFP}; ball ² , e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e | (c,e) |
| 37 | y w [*] ; P{en-lacZ ²⁵⁴ }esg/ Cy, P{ftz-lacZ}; ball ² , e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e | (d,e) |
| 38 | y w [*] ; P{lacZ ⁶⁰⁰ }; ball ² , e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e | (d,e) |
| 39 | w [*] ; ball ² , e P{neoFRT}82B Sb/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e | (e) |
| 40 | w [*] ; P{GAL4-nos.NGT}40; P{EP}ball ¹ , e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e | (e) |
| 41 | w [*] ; P{GAL4-nos.NGT}40; ball ² , e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e | (e) |
| 42 | w [*] ; P{UAS-ballGFP}; ball ² , e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e | (e) |
| 43 | w [*] ; p53 ^{5A-1-4} P{EP}ball ¹ / TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e | (e) |
| 45 | w [*] ; p53 ^{5A-1-4} ball ² / TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e | (e) |
| 46 | w [*] ; P{vasaGFP}; p53 ^{5A-1-4} P{EP}ball ¹ / TM3, P{w ^{trmC} =ActGFP}JMR2, Ser e | (c,e) |
| 47 | w [*] ; P{vasaGFP}; p53 ^{5A-1-4} ball ² / TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e | (c,e) |

Die Fliegenlinien wurden von R. Saint (a), dem Szeged Stock Center (<http://expbio.bio.u-szeged.hu/fly/>) (b), A. Ephrussi (c), S. DiNardo (d), aus dieser Arbeit (f) und vom Bloomington Stock Center (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>) (g) erhalten.

Folgende Markermutationen waren für die durchgeführten Kreuzungen von Bedeutung:

| | |
|----------------------|--|
| <i>Ovo (Ovo)</i> | weibliche Sterilität |
| <i>Curly (Cy)</i> | aufgebogene Flügel |
| <i>Stubble (Sb)</i> | kurze Borsten |
| <i>Drop (Dr)</i> | verkleinerte Augen |
| <i>ebony (e)</i> | Cuticula dunkel |
| <i>roughoid (ru)</i> | Augen kleiner, Ommatidien unregelmäßig |
| <i>white (w)</i> | Augenfarbe weiß |

Eine eingehende Beschreibung der Markermutationen und Balanzierchromosomen findet sich in Lindsley und Zimm (1992).

4.4.5 "Reinigung" und Balanzierung der EP0863-Insertionslinie

Die Linie EP0863-Insertionslinie wurde nach Erhalt vom Szeget Stock Center (siehe 4.4.4) von eventuellen zusätzlichen Mutationen befreit. Dazu wurden Jungfrauen in Einzelkreuzungen mit Männchen, die eine Mutation im *white*-Gen tragen und damit weißäugig sind (Linie Nr. 9), verkreuzt. Ziel war es, die Chromosomen durch Rekombination von zusätzlichen Mutationen zu reinigen. Die EP-Insertion konnte dabei über die rote Augenfarbe, die vom *mini-white* Gen des EP-Elements herrührt, verfolgt werden. Diese Kreuzung wurde insgesamt 3 x durchgeführt. Anschließend wurden einzelne Weibchen mit Doppelbalanzier-Männchen (Nr. 1) gekreuzt und eine stabile Linie etabliert, in der die EP-Insertion durch genomische PCR (siehe 4.2.3) bestätigt werden konnte:

(23) $w^{*}; P\{EP\}ball^1 / TM3, Sb e$

4.4.6 Rekombination zusätzlicher Marker auf das III. Chromosom

Anschließend wurden weitere Marker auf das EP tragende III. Chromosom rekombiniert. Dazu wurden homozygote Jungfrauen des *ball*¹-Allels mit Männchen einer Multimarkerlinie (Nr. 26) verkreuzt. In den F1-Weibchen bestand dann die Möglichkeit der Rekombination dieser Marker auf das EP-tragende Chromosom. Aus den F1-Weibchen konnte durch Einzelkreuzungen mit Doppelbalanzier-Männchen (Nr. 1) eine stabile Linie etabliert werden, die auf dem III. Chromosom zusätzlich zum EP-Element die rezessiven Marker *e* und *ru* besitzt:

(24) $w^{*}; P\{EP\}ball^1, e ru / TM3, Sb e$

Homozygote Jungfrauen dieses *ball*¹-Allels wurden mit verschiedenen Balanzier-Linien (Nr. 2, 3 und 4) gekreuzt, deren Marker eine Unterscheidung zwischen homozygoten und heterozygoten Tieren in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien erlaubten. Aus den Kreuzungen gingen folgende Linien hervor:

- (27) w^{;;}; P{EP}ball¹, e ru/ TM3, P{Ubx-lacZ} Sb e
 (28) y w^{;;}; P{EP}ball¹, e ru/ TM3 P{ftz-lacZ}, Sb e
 (29) y w^{;;}; P{EP}ball¹, e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e

4.4.7 Reversion des EP-Elements

Zur Herstellung weiterer Allele von *ball* wurde die EP-Insertion mobilisiert. Das EP-Element wird dabei nicht immer präzise aus dem Genom entfernt. Zusätzlich kann es zur Entfernung angrenzender genomischer Bereiche kommen. Zunächst wurde durch Kreuzen von homozygoten *ball*¹-Jungfrauen (Nr. 24) mit Transposase exprimierenden Männchen (Nr. 26) eine Transposasequelle in das Genom der *ball*¹-Linie eingebracht. Aus der F1-Generation wurden Männchen ausgewählt, die auf dem II. Chromosom die Transposase (Marker: Cy) und auf dem III. Chromosom die EP-Insertion besaßen. Diese Männchen wurden einzeln mit Doppelbalanzier-Jungfrauen (Nr. 1) gekreuzt. Aus der Nachkommenschaft wurden weißäugige, balanzierte Männchen, die keine Transposasequelle mehr trugen (also keinen Cy Marker besaßen) nochmals gegen Doppelbalanzierjungfrauen (Nr. 1) gekreuzt und als stabile Linie etabliert. Nach erfolgter Ablage wurde die genomische DNA dieser Männchen präpariert und die Mobilisierung des EP-Elements mittels genomischer PCR analysiert (siehe 4.2.3). Die neuen *ball*-Allele (siehe 2.4.1) wurden zur weiteren Analyse wie folgt balanziert:

- (30) y w^{;;}; ball^{rev}, e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e
 (31) y w^{;;}; ball², e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e
 (32) y w^{;;}; ball³, e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e

4.4.8 Einkreuzung von Reportergenen

Die Reportergene der Linien Nr. 16, 17 und 18 inserieren auf dem II. Chromosom. Diese Linien, sowie die mutanten *ball*-Allele Nr. 29 und Nr. 31 wurden zunächst durch Kreuzen mit der Balanzierlinie Nr. 4 auf dem II. und III. Chromosom balanziert und dann zusammengekreuzt:

- (33) w*; P{vasaGFP}; P{EP}ball¹, e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e
- (34) y w*; P{en-lacZ²⁵⁴}esg/ Cy, P{ftz-lacZ}; P{EP863}ball¹, e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e
- (35) y w*; P{lacZ⁶⁰⁰}; P{EP}ball¹, e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e
- (36) w*; P{vasaGFP}; ball², e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e
- (37) y¹ w*; P{en-lacZ²⁵⁴}esg/ Cy, P{ftz-lacZ}; ball², e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e
- (38) y¹ w*; P{lacZ⁶⁰⁰}; ball², e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e

4.4.9 Herstellung maternaler Klone von *bällchen*

Um die maternale *ball*-Komponente ausschalten zu können, mussten Keimbahnchimäre nach dem Prinzip von Chuo und Perrimon (1992) mit dominanten Markern und einem Heferekombinasesystem (Golic und Lindquist, 1998) hergestellt werden.

Im ersten Schritt wurde zur *ball*²-Mutation eine FRT-Erkennungsstelle in Nähe des Centromers auf das III. Chromosom rekombiniert. Dazu wurden Jungfrauen einer Neomycin-resistenten FRT-Linie (Nr. 10) mit heterozygoten Männchen des *ball*²-Allels (Nr. 31) verkreuzt. Die gewünschten Balanzier-freien Nachkommen besaßen die Markerkombination *Sb*, *w*. Die Rekombination erfolgte dann in den F1-Weibchen. Diese wurden mit Balanzier-Männchen (Nr. 1) verkreuzt. Die erfolgreiche Rekombination wurde an der folgenden Ablage auf zwei Arten selektiert: einmal erfolgte eine Neomycinselektion durch Beigabe von 200 µl G418 (25 mg/ml; A.G Scientific; San Diego, USA) auf das Futter in mittleren Fliegenröhrchen. Zum zweiten wurden F2-Weibchen auf die Präsenz der Marker *Sb* und *Hu* hin selektiert und durch Kreuzung mit einer Defizienzlinie (Nr. 8) auf puppale Letalität hin getestet. So konnte eine stabile Linie etabliert werden:

- (39) w*; ball², e P{neoFRT}82B *Sb*/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e

Im zweiten Schritt wurden Männchen erzeugt, die ein Flippase-Expressionskonstrukt auf dem X-Chromosom (Nr. 13) und die weibliche Sterilität bewirkende Mutation *OvoD* (Nr. 12) zusammen mit der gleichen FRT-Erkennungsstelle wie oben auf dem III. Chromosom tragen:

- (39a) P{hsFLP}1, w*; P{neoFRT}82B P{ovoD1-18}3R/ TM3, *Sb* e

Im dritten Schritt wurden Jungfrauen (Nr. 39) mit Männchen aus Nr. 39a gekreuzt. Die Fliegen wurden jeden Tag in frische Röhrchen transferiert. Die Ablagen wurden zu mehreren Zeitpunkten der Entwicklung (am zweiten, dritten und vierten Tag nach der Ablage) einem Hitzeschock (39,5°C für 1 h) ausgesetzt. Durch den Hitzeschock wird die Flippase, die unter Kontrolle des *hsp70*-Promotors steht, exprimiert und vermittelt zellautonom die FRT-sequenzspezifische Rekombination (Chou und Perrimon, 1992). In weiblichen Larven, die neben der Flippase auf dem I. Chromosom auch die *ball*²-Mutation und *ovoD* auf dem III. Chromosom enthielten, konnte so die Rekombination in den Keimbahnstammzellen induziert werden. Durch die Rekombination wurden Keimbahnstammzellen geschaffen, die homozygot mutant für *ball*² waren. Diese Keimbahnstammzellen konnten sich theoretisch zu ablagereifen Eiern entwickeln. Alle übrigen Keimbahnstammzellen enthielten die dominante Mutation *ovoD*, die bereits sehr früh zu einem Arrest der Oogenese führt (Chou et al. 1993). Von den schlüpfenden Fliegen wurden Jungfrauen gesammelt, die nicht balanziert waren. Sie wurden mit Wildtyp-Männchen zusammengesetzt und so zur Eiablage stimuliert.

4.4.10 Herstellung transgener Fliegen

Zur Herstellung der transgenen UAS-Linie wurde zunächst Plasmid-DNA des Konstrukts UAS*ball*/GFP (siehe 4.2.5) mittels einer Plasmid-Midi-Präparation aus Bakterien gewonnen (siehe 4.2.2). Anschließend folgte eine weitere Reinigung (siehe 4.2.2) mittels Phenol-Extraktion, gefolgt von einer Ethanol-Fällung und Lösung des DNA-Pellets in Tris/HCl (10 mM, pH 7,5). 12 µg wurden dann mit 4 µg Helferplasmid (Laski et al., 1986) gemischt, erneut gefällt und in 20 µl Wasser gelöst. Zur Herstellung transgener Fliegen wurde diese Lösung (450 ng/µl Konstrukt, 150 ng/µl Helferplasmid) in etwa 300 Präblastoderm-Embryonen des Stammes Df(1)w^{67c23} (Lefevre und Green, 1972; die Injektionen wurden von U. Jahns-Meyer vorgenommen) injiziert.

Durch die Aktivität der vom Helferplasmid kodierten Transposase wird das Plasmid in einigen der injizierten Embryonen in das Genom der sich entwickelnden Keimzellen integriert (Laski et al, 1986). Die aus den injizierten Embryonen herangereiften adulten Fliegen wurden mit dem w^{67c23}-tragenden Ausgangsstamm rückgekreuzt. Individuen der Nachkommenschaft dieser Kreuzungen (F1-Generation) wurden durch Kontrolle der Augenfarbe auf die stabile Integration eines P-Elementes überprüft (das P-Element

enthält eine "Rescue"-Kopie der *w*-Mutation, die Träger des Elementes haben daher im Gegensatz zu den weißäugigen *w*^{67c23}-Fliegen eine rötliche Augenfarbe). Transgene Fliegen wurden durch Kreuzung mit dem Ausgangsstamm amplifiziert (F2-Generation). Durch Kreuzungen mit Balanzierchromosomen wurde bestimmt, auf welchem Chromosom die Integration erfolgte. So konnte eine Linie etabliert werden, in der das UAS-Konstrukt auf dem II. Chromosom integriert ist.

(22) *w**; P{UAS-ballGFP}

4.4.11 GAL4/UAS-Experimente

Die Missexpressions-Experimente wurden mit Hilfe des Gal/UAS-Systems durchgeführt (Brand und Perrimon, 1993). Die Fähigkeit zur ektopischen Expression von *ball* durch Treiben des EP-Elements (siehe 2.3.1) wurden homozygote Jungfrauen des *ball*¹-Allels (Nr. 29) mit homozygoten Männchen einer Treiberlinie verkreuzt, die den Transkriptionsfaktor GAL4 unter Kontrolle von Promotoren des Gens *engrailed* (*en*) exprimiert (Nr. 19). Die 0-4 h Gelege dieser Kreuzungen wurden dann zur Induktion der Expression für 2-4 h bei 29 °C inkubiert und anschließend fixiert (siehe 4.2.3). Die Expression wurde durch Antikörperfärbung (siehe 4.3.4) mit einem anti-Ball-Antikörper (siehe 4.3.5) überprüft.

Für die Keimbahnrettungsexperimente (siehe 2.6.8) wurde *ball* mit einem Treiber exprimiert, der GAL4 unter Kontrolle von Promotorsequenzen des Gens *nanos* (*nos*) spezifisch in den Keimzellen exprimiert (Van Doren et al., 1998, Schulz et al., 2004). Die Überexpression von *ball* wurde im *ball*¹-Allel über UAS-Sequenzen im EP-Element induziert (Rorth et al., 1996). Dafür wurden das *ball*¹-Allel (Nr. 29) und die *nos*GAL4-Treiberlinie (Nr. 21) durch jeweiliges Kreuzen mit Mehrfachbalanzierlinien auf dem II. und III. Chromosom balanziert. Anschließend wurde aus den balanzierten Linien durch Kreuzung eine Linie etabliert, die das GAL4-exprimierende Transgen auf dem II. Chromosom und die EP-Insertion auf dem III. Chromosom trägt:

(40) *w**; P{GAL4-nos.NGT}40; P{EP}ball¹, e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e

Die Induktion erfolgte bei 22°C. Adulte Männchen wurden auf wieder gewonnene Fertilität getestet, indem sie über mehrere Tage mit fertilen Jungfrauen eines Wildtypstammes zusammengesetzt wurden.

In den Rettungsexperimenten (siehe 2.6.8) für das *ball*²-Allel wurde das UAS*ball*GFP-Transgen für die ektopische *ball*-Expression mithilfe der *nos*GAL4-Treiberlinie (Nr. 21) genutzt. Dazu wurden zunächst das Treiber-Transgen bzw. das UAS*ball*GFP-Transgen (Nr. 22) in das Genom des *ball*²-Allels eingekreuzt:

(41) w*; P{GAL4-*nos*.NGT}40; *ball*², e ru/ TM3, P{GFP}JMR2, Ser e

(42) w*; P{UAS-*ball*GFP}; *ball*², e ru/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e

Männchen aus Nr. 41 wurden dann mit Jungfrauen aus Nr. 42 gekreuzt. Die Ablagen wurden bei 22°C bis zur Präparation inkubiert. Die aus dieser Kreuzung hervorgehenden Individuen enthalten alle je eine Kopie des Treiber-Transgens und des UAS*ball*GFP-Transgens auf dem II. Chromosom und außerdem mindestens eine Kopie der *ball*²-Mutation. Homozygote und heterozygote *ball*²-Larven lassen sich durch die GFP-Expression des Balanzierchromosoms voneinander unterscheiden.

4.4.12 Herstellung von *ball*/*Dmp53*- Doppelmutanten

Zum Test einer möglichen genetischen Interaktion von *ball* und *Dmp53* wurden durch Rekombination auf dem III. Chromosom Doppelmutanten hergestellt. Homozygote *ball*¹- und *ball*²-Jungfrauen wurden mit homozygoten Männchen des *Dmp53*-Nullallels (Linie Nr. 15) gekreuzt. Aus dieser Kreuzung gingen F1-Jungfrauen hervor, die transheterozygot für ein *ball*-Allel und für das *Dmp53*-Nullallel waren. In der Keimbahn dieser Jungfrauen konnte theoretisch eine Rekombination der beiden Mutationen auf das selbe Chromosom erfolgen. Die Jungfrauen wurden in Einzelkreuzungen mit Männchen einer Balanzierlinie (Nr. 1) gekreuzt. Aus der Nachkommenschaft wurden Männchen, die das Balanzierchromosom TM3 enthielten, zur Etablierung stabiler Linien einzeln mit Jungfrauen der Balanzierlinie Nr. 1 gekreuzt. Nach erfolgreicher Ablage wurde die DNA der Männchen präpariert (siehe 4.2.2) und die Rekombination durch genomische PCR kontrolliert (siehe 4.2.3). Für beide mutante *ball*-Allele konnten Doppelmutanten mit dem *Dmp53*-Nullallel erzeugt werden. Zur

weiteren Analyse wurden diese Linien zum einen mit einer GFP-exprimierenden Balanzierlinie (Nr. 4) gekreuzt:

(43) w*;; p53^{5A-1-4} P{EP}ball¹/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e

(44) w*;; p53^{5A-1-4} ball²/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e

Außerdem wurde, wie für die *ball*-Allele weiter oben beschrieben, ein *vasa*GFP-Reporter gen (Nr. 16) in das Genom eingebracht:

(45) w*;; P{vasaGFP}; p53^{5A-1-4} P{EP}ball¹/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e

(46) w*;; P{vasaGFP}; p53^{5A-1-4} ball²/ TM3, P{ActGFP}JMR2, Ser e

4.5 allgemeine Puffer und Reagenzien

| | |
|-------------------------|--|
| Acrylamid-Sammelgel: | 1 ml: 17 μ l 30% Acrylamid-Mix; 130 μ l 1 M Tris pH 6,8; 10 μ l 10% SDS; 10 μ l 10% Ammoniumpersulfat; 1 μ l TEMED; 680 μ l H ₂ O |
| Acrylamid-Trenngel: | 5 ml, 10%ig: 1,7 ml 30% Acrylamid-Mix ; 1,3 ml 1,5 M Tris pH 8,8; 50 μ l 10% SDS; 50 μ l 10% Ammoniumpersulfat; 2 μ l TEMED; 1,9 ml H ₂ O |
| Coomassie-Färbelösung: | 50% EtOH; 7% HAc; 0,2% Coomassie brilliant blue; 43% H ₂ O |
| DNA-Auftragungspuffer: | 10 x: 0,1% Bromphenolblau; 0,9% Borsäure; 0,1% Xylencyanol; 40% Glycerin in TBE bzw. TAE |
| DNA-Lyse-Puffer: | 20 mM TrisHCl pH7,5; 200 mM NaCl; 20 mM EDTA; 2% SDS |
| Laemmli-Blot-Puffer: | 25 mM Tris-Base; 250 mM Glycin; pH 8,3; 20 % Methanol |
| PBS: | 130 mM NaCl; 7 mM Na ₂ HPO ₄ ; 3 mM Na ₂ H ₂ PO ₃ ; pH 7.4 |
| PBT: | 0,1% Tween 20 in PBS |
| Proteingelfixierpuffer: | 30% EtOH; 10% HAc; 60% H ₂ O |
| SDS-Laufpuffer: | 25 mM Tris-Base; 250 mM Glycin; pH 8,3; 0,1% SDS |
| SDS-Probenpuffer: | 2 x: 4% SDS; 20% Glycerin; 0,1% Bromphenolblau; 100 mM Tris-HCl pH6,8; 1 mM DTT frisch dazugeben |
| Squishing-Puffer: | 10 mM Tris-Cl pH 8,2; 1 mM EDTA; 25 mM NaCl |
| SSC: | 20 x: 3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat; pH 7,0 |
| TBE: | 1 M Borsäure; 1 M Tris; 20 mM EDTA; pH 7,8). |

4.5.1 Herstellung des Einbettmediums Mowiol

Das Medium Mowiol wurde zur Einbettung von fluoreszenzgefärbten Embryonen verwendet. Für seine Herstellung wurden 12 g Glycerol mit 4,8 g Mowiol (Hoechst, Frankfurt) etwa 1 h bei RT auf dem Magnetrührer vermischt, dann 12 ml Wasser hinzugefügt und weitere 2 h bei RT verrührt. Nach Zugabe von 24 ml Tris/HCl Puffer (200 mM, pH 8,5) wurde bei 50°C weitergerührt. Ungelöste Bestandteile wurden anschließend bei 8000 x g abzentrifugiert, der Überstand aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

4.6 Statistik

Statistische Analysen wurden mithilfe von Microsoft Excel (Bestimmung von Mittelwert und Standardabweichung) und einem t-Test für unabhängige Stichproben (siehe <http://faculty.vassar.edu/lowry>) zur Bestimmung von Signifikanzen durchgeführt.

4.7 Abkürzungen

| Abb | Abbildung |
|-------|---|
| As | Aminosäuren |
| BCIP | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat |
| Bp | Basenpaare |
| C- | Carboxy |
| cDNA | zu mRNA komplementäre DNA |
| Ci | Curie |
| DAB | Diaminobenzidintetrahydrochlorid |
| dATP | Desoxyadenosin-Triphosphat |
| dCTP | Desoxycytidin-Triphosphat |
| dGTP | Desoxyguanosin-Triphosphat |
| DIG | Digoxigenin |
| DMF | Dimethylformamide |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Desoxynukleosid-Triphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| dUTP | Desoxyuridin-Trisphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat |

| | |
|-------------|---|
| FLUO | Fluorescein |
| EGFP | Enhanced Green Fluorescent Protein |
| GST | Glutathione S-transferase |
| h | Stunde |
| HEPES | N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure |
| IPTG | Isopropyl-beta-D-thiogalactoside |
| kBp | Kilobasenpaare |
| kJ | kilo Joule |
| KSZ | Keimbahnstammzellen |
| LB | Luria-Bertani-Medium |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| mRNA | Boten-Ribonukleinsäure |
| NABP | Naphtol As Biphosphat |
| N- | Amino- |
| NBT | 4-Nitroblautetrazoliumchlorid |
| NHS | Normal Horse Serum |
| nm | Nanometer |
| ng | Nanogramm |
| OD | Optische Dichte |
| OLR | Offener Leserahmen |
| pmol | Picomol |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| RNase | Ribonuklease |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sec | Sekunde |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| Tris | Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan |
| TritonX-100 | Octylphenolpolyethylenglycolether |
| Tween20 | Polyoxyethylensorbitanmonolaurat |
| U | Unit (Einheit der Enzymaktivität) |
| UAS | Upstream Activation Site |
| ÜN | über Nacht |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| UTR | Untranslatierter Bereich |
| UV | Ultraviolett |
| X-Gal | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl βD-galactosidase |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |
| μl | Mikroliter |

5 Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung der Keimbahnstammzellen im Testis von *Drosophila melanogaster*, die durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung charakterisiert sind. Die Bildung von Tochterzellen mit unterschiedlichem Entwicklungspotential, das heißt Erhalt des Stammzellpotentials bzw. Keimzellentwicklung, wird durch asymmetrische Teilungen der Stammzellen erreicht, ein Prozess, der von der unmittelbaren Stammzellumgebung, der sogenannten Stammzellnische, beeinflusst wird.

Die Arbeit beschreibt die Funktion des Gens *bällchen* (*ball*) während der frühen Spermatogenese. Die molekulare Charakterisierung des Gens zeigt, dass es für eine kernlokalisierte Serin/Threonin-Kinase codiert. Für die Funktionsanalyse des Gens wurden spezifische Mutanten hergestellt. Diese weisen Allel-spezifische Defekte in der kontinuierlichen Produktion von Keimzellen auf. Die Defekte gehen sowohl bei hypomorphen als auch amorphen *ball*-Mutationen auf den Verlust der Keimbahnstammzellen zurück. Eine Differenzierung der wenigen überlebenden Keimzellen ist jedoch prinzipiell möglich. Keimzellautonome *ball*-Expression, die Transgen-abhängig in *ball*-Mutanten vermittelt wurde, zeigt, dass *ball*-Aktivität in den Keimzellen für den Erhalt der Keimbahn hinreichend ist.

ball wird auch in den Stammzellpopulationen der weiblichen Keimbahn und des Nervensystems exprimiert. Bei amorphen *ball*-Mutanten werden in den entsprechenden Derivaten mutationsbedingte Phänotypen beobachtet, die wiederum auf Proliferationsdefekte schließen lassen. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass *ball* als intrinsischer Stammzellsfaktor nicht nur in der männlichen Keimbahn benötigt wird.

Die Ergebnisse sind mit der Hypothese vereinbar, dass *ball*-mutante Keimbahnstammzellen durch Proliferationsdefekte absterben und die Keimbahndifferenzierung der überlebenden Zellen nicht betroffen ist. Diese Hypothese bietet eine Erklärung für eine zellautonome Funktion von *ball* bei der Proliferation der Stammzellen. Dabei könnte die Serin/Threonin-Kinase Bällchen bei der Transduktion extrazellulärer Signale, bei der Regulation des Zellzyklus und/oder der Transkriptionskontrolle eine Rolle spielen.

6 Literatur

Adams M. D., Celniker S. E., Holt R. A., Evans C. A., Cocayne J. D., Amanatides P. G., Scherer S. E. et al., (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science 287: 2185-2195.

Adams, J. M. (2003). Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. Genes Dev. 17: 2481-2495.

Aihara, H., Nakagawa, T., Yasui, K., Ohta, T., Hirose, S., Dhomae, N., Takio, K., Kaneko, M., Takeshima, Y., Muramatsu, M. und Ito, T. (2004). Nucleosomal histone kinase-1 phosphorylates H2A Thr 119 during mitosis in the early *Drosophila* embryo. Genes Dev 18: 877-888.

Alphay, L., Jimenez, J., White-Cooper, H., Dawson, I., Nurse, P. und Glover, D. M. (1992). *twine*, a *cdc25* homolog that functions in the male and female germline of *Drosophila*. Cell 69: 977-988.

Ashburner, M. (1989). *Drosophila: A Laboratory Handbook and Manual*. Two volumes. Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J.G., Smith J. A. und Struhl K. (1995). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons.

Bellen, H. J., O'Kane, C. J., Wilson, C., Grossniklaus, U., Pearson, R. K. und Gehring, W. J. (1989). P-element mediated enhancer detection; a versatile method to study development in *Drosophila*. Genes Dev. 3: 1288-1300.

Bhat, K. M. und Schedl, P. (1997). Establishment of stem cell identity in the *Drosophila* germline. Dev. Dyn. 210: 371-382.

Bier, E., Vaessin, H., Shepherd, S., Lee, K., McCall, K., Barbel, S., Ackerman, L., Carreto, R., Grell, E., Jan, L. Y. und Jan, Y. N. (1989). Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a P-lacZ vector. Genes Dev. 3: 1273-1287.

Boyle, K. A. und Traktman, P. (2004). Members of a Novel Family of Mammalian Protein Kinases Complement the DNA-Negative Phenotype of a Vaccinia Virus *ts* Mutant Defective in the B1 Kinase. J. Virol. 78: 1992-2005.

Boyle, M. und DiNardo, S. (1995). Specification, migration and assembly of the somatic cells of the *Drosophila* gonad. Development 121: 1815-1825.

Bradbury, E. M. (1992). Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. Bioessays 14: 9-16.

- Brand, A. H. und Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118(2): 401-415.
- Brawley, C. und Matunis, E. (2004). Regeneration of male germline stem cells by spermatogonial dedifferentiation *in vivo*. *Science* 28: 1331-1334.
- Brinster, R. L. und Zimmermann, J. W. (1994). Spermatogenesis following germ-cell transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11298-11302.
- Broadus, J., Fuerstenberg, S. und Doe, C. Q. (1998). Stufen dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* 391: 792-795.
- Brodsky, M. H., Nordstrom, W., Tsang, G., Kwan, E., Rubin, G. M. und Abrams, J. M. (2000). *Drosophila* p53 Binds a Damage Response Element at the *reaper* Locus. *Cell* 101: 103-113.
- Brower, D.L., Smith, R. J. und Wilcox, A. (1981). Differentiation within the gonads of *Drosophila* revealed by immunofluorescence. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 63: 233-242.
- Bush, H. und Smetana, K. (1970). The nucleolus. Academic. New York.
- Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W., Weber, J. M., Olson, D. P., Knight, M. C., Martin, R. P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F. R., Milner, L. A., Kronenberg, H. M. und Scadden, D. T. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425: 841-846.
- Campos-Ortega, J. A. und Hartenstein, V. (1985). The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*. Berlin. Springer-Verlag.
- Campos-Ortega, J. A. und Hartenstein, V. (1997). The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*. Berlin. Springer-Verlag.
- Castrillon, D. H., Gönczy, P., Alexander, S., Rawson, R., Eberhard, C. G., Viswanathan, S., DiNardo, S. und Wassermann, S. A. (1993). Toward a Molecular Genetic Analysis of Spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: Characterization of Male-Sterile Mutants Generated by Single *P* Element Mutagenesis. *Genetics* 135: 489-505.
- Cerutti, L., Mian, N. und Bateman, A. (2000). Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem. Sci.* 25: 481-482.
- Cheung, P. Allis, C. D und Sassone-Corsi, P. (2000). Signaling to Chromatin through Histon Modifications. *Cell* 103: 263-271.
- Chou, T. B. und Perrimon, N. (1992). Use of a yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in *Drosophila*. *Genetics* 131: 643-653.

- Chou, T. B., Noll, E. und Perrimon, N. (1993). Autosomal P[ovoD1] dominant female-sterile insertions in *Drosophila* and their use in generating germ-line chimeras. *Development* 119(4):1359-1369.
- Clarkson, M. und Saint, R. (1999). A *His2AvDGFP* fusion gene complements a lethal *His2AvD* mutant allele and provides an *in vivo* marker for *Drosophila* chromosome behavior. *DNA Cell Biol* 18(6): 457-462.
- Cohen, S. (1993). Imaginal Disc Development. In: *The Development of Drosophila melanogaster*. (M. Bates und A. M. Arias, Editoren). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.: 747-842.
- Cohen, S. M. (1993). Imaginal Disc Development. In: *The Development of Drosophila melanogaster*. (M. Bates und A. M. Arias, Editoren). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY: 747-842.
- Courtot, C., Fankhauser, C., Simanis, V. und Lehner, C. F. (1992). The *Drosophila* *cdc25* homolog *twine* is required for meiosis. *Development* 116: 405-416.
- Cox, D. N., Chao, A. und Lin, H. (2000). *piwi* encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germ line cysts. *Development* 127: 503-514.
- Cox, D. N., Chao, A., Baker, J., Chang, L. Qiao, D. und Lin, H. (1998). A novel class of evolutionarily conserved genes defined by *piwi* are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev.* 12: 3715-3727.
- de Rooij, D. G. und Grootegoed, J. A. (1998). Spermatogonial stem cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10: 694-701.
- Deng, W. und Lin, H. (1997). Spectrosomes and fusomes anchor mitotic spindles during asymmetric germ cell division and facilitate the formation of polarized microtubule array for oocyte specification in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 189: 79-94.
- Doe, C. Q. (1992). Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system. *Development* 116: 855-863.
- Doe, C. Q. und Goodman, C. S. (1985). Early events in insect neurogenesis. I. Development and segmental differences in the pattern of neuronal precursor cells. *Dev. Biol.* 111: 193-205.
- Doe, C. Q., Chu-LaGraff, Q., Wright, D. M. und Scott, M. P. (1991). The *prospero* gene specifies cell fates in the *Drosophila* central nervous system. *Cell* 65: 451-464.
- Du, Y.-C. N. und Stillman, B. (2002). Yph1p, an ORC-Interacting Protein: Potential Links between Cell Proliferation Control, DNA Replication, and Ribosome Biogenesis. *Cell* 109: 835-848.

- Dumstrei, K., Wang, F. und Hartenstein, V. (2003). Role of DE-Cadherin in Neuroblast Proliferation, Neural Morphogenesis, and Axon Tract Formation in *Drosophila* Larval Brain Development. *J. Neurosci* 23: 3325-3335.
- Fischer, J. A., Giniger, E., Maniatis, T. und Ptashne, M. (1988). GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature* 332(6167): 853-6.
- Fischle, W., Wang, Y. und Allis, C. D. (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 172-183.
- Foe, V. E., Odell, G. M. und Edgar, B. A. (1993). Mitosis and Morphogenesis in the *Drosophila* embryo: Point and counterpoint. In: *The Development of Drosophila melanogaster*. (M. Bates und A. M. Arias, Editoren). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY: 149-300.
- Fujita, S. C., Zipursky, S. L., Benzer, S., Ferrus, A. und Shotwell, S. L. (1982). Monoclonal antibodies against the *Drosophila* nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 79(24):7929-33.
- Fuller, M. T. (1993). Spermatogenesis. In: *The Development of Drosophila melanogaster*. (M. Bates und A. M. Arias, Editoren). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY: 71-148.
- Giglione, C., Devergne, O., Georgenthum, E., Carballès, F. und Médioni, C. (2002). The *Drosophila* cytokine receptor Domeless controls border cell migration and epithelial polarization during oogenesis. *Development* 129: 5437-5447.
- Gilbert, S. F., (1997). *Developmental Biology*. 5. Auflage. Sunderland. Sinauer Associates.
- Gilboa, L. und Lehmann, R. (2004). How different is Venus from Mars? The genetics of germ-line stem cells in *Drosophila* females and males. *Development* 131: 4895-4905.
- Golic, K. G. und Lindquist, S. (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* 59: 499-509.
- Gönczy, P. und DiNardo, S. (1996). The germ line regulates somatic cyst cell proliferation and fate during *Drosophila* spermatogenesis. *Development* 122: 2437-2447.
- Gönczy, P., Matunis, E. und DiNardo, S. (1997). *bag-of-marbles* and *benign gonial cell neoplasm* act in the germline to restrict proliferation during *Drosophila* spermatogenesis.
- Gönczy, P., Wiswanathan, S. und DiNardo, S. (1992). Probing spermatogenesis in *Drosophila* with P-element enhancer detectors. *Development* 114: 89-98.

- Goto, H., Tomono, Y., Ajiro, K., Kosako, H., Fujita, M., Sakurai, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Okigaki, T., Takahashi, T. und Inagaki, M. (1999). Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J. Biol. Chem.* 274: 25543-25549.
- Greenspan, R. J. (1997). Fly pushing: the theory and practice of *Drosophila* genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
- Grummt, I. und Picaard, C. S. (2003). Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4(8): 641-649.
- Hardy, R. W., Tokayasu, K. T., Lindsley, D. L. und Garavito, M. (1979). The germinal proliferation center in the testis of *Drosophila melanogaster*. *J. Ultrastruct. Res.* 69: 180-190.
- Hartenstein, V. und Campos-Ortega, J. A. (1984). Early neurogenesis in wild-type *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 193: 308-325.
- Hartenstein, V., Rudloff, E. und Campos-Ortega, J. A. (1987). The pattern of proliferation of the neuroblasts in the wild-type embryo of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 196: 473-485.
- Hay, B., Ackerman, L., Barbel, S., Jan, L. Y. und Jan, Y. N. (1988a). Identification of a component of *Drosophila* polar granules. *Development* 103: 625-640.
- Hay, B., Jan, L. Y. und Jan, Y. N. (1988b). A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by *vasa* and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. *Cell* 55: 577-587.
- Hofbauer, H. und Campos-Ortega, J. A. (1990). Proliferation pattern and early differentiation of the optic lobes in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 198: 264-274.
- Hsu, J. Y., Sun, Z. W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D. K., Grushcow, J. M., Brame, C. J., Caldwell, J. A., Hunt, D. F., et al. (2000). Mitosis specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106: 348-360.
- Huettnner, A. F. (1923). The origin of the germ cells in *Drosophila melanogaster*. *J. Morphol.* 39: 249-65.
- Hummel, T., Krukkert, K., Roos, J., Davis, G. und Klämbt, C. (2000). *Drosophila* Futsch/22C10 is a MAP1B-like protein required for dendritic and axonal development. *Neuron* 26(2): 357-370.
- Jacobson, M. D., Weil, M. und Raff, M. C. (1997). Programmed Cell Death in Animal Development. *Cell* 88: 347-354.

- Jin, S., Martinek, S., Joo, W. S., Wortman, J. R., Mirkovic, N., Sali, A., Yandell, M. D., Pavletich, N. P., Young, M. W. und Levine, A. J. (2000). Identification and characterization of a *p53* homologue in *Drosophila melanogaster*. PNAS 97 (13): 7301-7306.
- Kai, T. und Spradling, A. (2004). Differentiating germ cells can revert into functional stem cells in *Drosophila melanogaster* ovaries. Nature 428: 564-569.
- Kaltschmidt, J. A., Davidson, C. M., Brown, N. H. und Brand, A. H. (2000). Rotation and asymmetry of the mitotic spindle direct asymmetric cell division in the developing central nervous system. Nat Cell Biol. 2: 7-12.
- Kamath, R. S., Fraser, A. G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M. et al. (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. Nature 421: 231-237.
- Kawase, E., Wong, M. D., Ding, B. C. und Xie, T. (2004). Gbb/Bmp signaling is essential for maintaining germline stem cells and for repressing *bam* transcription in the *Drosophila* testis. Development 131: 1365-1375.
- Kiger, A. A., Jones, D. L., Schulz, C., Rogers, M. B. und Fuller, M. T. (2001). Stem Cell Self-Renewal Specified by JAK-STAT Activation in Response to a Support Cell Cue. Science 294: 2542-2545.
- Kiger, A. A., White-Cooper, H. und Fuller, M. T. (2000). Somatic support cells restrict germline stem cell self-renewal and promote differentiation. Nature 407: 750-754.
- King, R. C. (1970). Ovarian Development in *Drosophila melanogaster*. Academic Press. New York.
- Knoblich, J. A., Jan, L. Y. und Jan, Y. N. (1995). Asymmetric segregation of Numb and Prospero during cell division. Nature 377: 624-627.
- Kornberg, T., Siden, I., O'Farrell, P. und Simon, M. (1985). The *engrailed* locus of *Drosophila*: *in situ* localization of transcripts reveals compartment-specific expression. Cell 40: 45-53.
- Laski, F. A., Rio, D. C. und Rubin, G. M. (1986). Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. Cell 44(1): 7-19.
- Lee, J. R., Urban, S., Garvey, C. F. und Freeman, M. (2001). Regulated intracellular ligand transport and proteolysis control EGF signal activation in *Drosophila*. Cell 107: 161-171.
- Lefevre, G. und Green, M. M. (1972). Genetic duplication in the white-split interval of the X chromosome in *Drosophila melanogaster*. Chromosoma 36.

- Lehner, C. und O'Farrell, P. H. (1990). The roles of *Drosophila* cyclin A and cyclin B in mitotic control. *Cell* 61: 535-547.
- Levine, A., J. (1997). *p53*, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* 88: 323-331.
- Lin, H. (2002). The stem-cell niche theory: lessons from flies. *Nat. Rev. Genet.* 12: 931-940.
- Lin, H. und Spradling, A. (1997). A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* 124: 2463-2476.
- Lin, H. und Spradling, A. C. (1993). Germ line stem cell division and egg chamber development in transplanted *Drosophila* germaria. *Dev. Biol.* 159: 140-152.
- Lin, H., Yue, L. und Spradling, A. S. (1994). The *Drosophila* fusome, a germline specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in in cyst formation. *Development* 120: 947-956.
- Lindsley, D. L und Tokayasu, K. T. (1980). Spermatogenesis. In: *The Genetics and Biology of Drosophila*. (M. Ashburner und T. R. F. Wright, Editoren). Academic Press, New York. 2: 225-294.
- Lindsley, D. L. und Zimm, G. G. (1992). *The genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego. ISBN 0-12-450990-8.
- Lopez-Borges, S. und Lazo, P. A. (2000). The human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) phosphorylates threonine-18 within the mdm-2 binding site of the p53 tumor suppressor protein. *Oncogene* 19: 3656-3664.
- Lowe, S. W., Schmitt, E. M., Smith, S. W., Osborne B. A. und Jacks, T. (1993). *p53* is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362: 847-849.
- Mahowald, A. P. und Kambyzellis, M. P. (1980). Oogenesis. In: *The Genetics and Biology of Drosophila*. (M. Ashburner und T. R. F. Wright, Editoren). Academic Press, New York. 2: 141-224.
- Mahowald, A. P. (1962). Fine structure of pole cells and polar granules in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.* 151: 201-205.
- Matsuzaki, F., Koizumi, K., Hama, C., Yoshioka, T. und Nabeshima, Y. (1992). Cloning of the *Drosophila prospero* gene and its expression in ganglion mother cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182: 1326-1332.
- Matunis, E., Tran, T., Gönczy, P. und DiNardo, S. (1997). *punt* and *schnurri* regulate a somatically derived signal that restricts proliferation of committed progenitors in the germline. *Development* 124: 4383-4391.

- McGregor, J. R., Xie, R. und Harrison, D. A. (2002). JAK signaling is somatically required for follicle cell differentiation in *Drosophila*. *Development* 129: 705-717.
- Meier, P., Finch, A. und Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature* 407: 796-801.
- Meinertzhagen, I. A. und Hanson, T. E. (1993). The Development of the Optic Lobe. In: *The Development of Drosophila melanogaster*. (M. Bates und A. M. Arias, Editoren). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY: 1363-1492.
- Nezu, J., Oku, A., Jones, M. H. und Shimane, M. (1997). Identification of Two Novel Human Putative Serine/Threonine Kinases, VRK1 and VRK2, with Structural Similarity to Vaccinia Virus B1R Kinase. *Genomics* 45: 327-331.
- Nichols, R. J. und Traktman, P. (2004). Characterization of Three Paralogous Members of the mammalian Vaccinia Related Kinase Family. *Journal Biol. Chem.* 279 (9): 7934-7946.
- Olivieri, G. und Olivieri, A. (1965). Autoradiographic study of nucleic acid synthesis during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 2: 366-380.
- Ollmann, M., Young, L. M., DiComo, C. J., Karim, F., Belvin, M., Robertson, S., Whittaker, K., Demsky, M., Fisher, W. W., Buchman, A., Duyk, G., Friedmann, L., Prives, C. und Kopczynski, C. (2000). *Drosophila p53* Is a Structural and Functional Homolog of the Tumor Suppressor *p53*. *Cell* 101: 91-101.
- Pal-Bhadra, M., Bhadra, U. und Birchler, J. A. (2002). RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional gene silencing in *Drosophila*. *Mol. Cell* 9: 315-327.
- Pal-Bhadra, M., Leibovitch, B. A., Gandhi, S. G., Rao, M., Bhadra, U., Birchler, J. A. und Elgin, S. (2004). Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science* 303: 669-672.
- Pederson, T. (1998). Growth factors in the nucleolus? *J. Cell Biol.* 143(2): 279-281.
- Piano, F., Schetter, A. J., Morton, D. G., Gunsalus, K. C., Reinke, V., Kim, S. K. und Kemphues, K. J. (2002). Gene clustering based on RNAi phenotypes of ovary – enriched genes in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 12: 1959-1964.
- Poirié, M., Niederer, E. und Steinmann-Zwicky, M. (1995). A sex-specific number of germ cells in embryonic gonads of *Drosophila*. *Development* 121: 1867-1874.
- Rempel, R. E., Anderson, M. K., Evans, E. und Traktman, P. (1990). Temperature-sensitive vaccinia virus mutants identify a gene with an essential role in viral replication. *J. Virol.* 66: 574-583.
- Roberts, D. B. (1986). *Drosophila*. A practical approach. Oxford. IRL Press.

- Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C. und Bonner, W. M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo*. J. Cell Biol. 146: 905–916.
- Rogakou, E. P., Nieves-Neira, W., Boon, C., Pommier, Y. und Bonner, W. M. (2000). Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. J. Biol. Chem. 275: 9390-9395.
- Rong Y. S., Titen S. W., Xie H. B., Golic M. M., Bastiani M., Bandyopadhyay P., Olivera B. M., Brodsky M., Rubin G. M. und Golic K. G. (2002). Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*. Genes Dev. 16(12): 1568-1581.
- Rorth, P. (1996). A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 12418–12422.
- Rorth, P. (1998). Gal4 in the *Drosophila* female germline. Mech Development 78: 113-118.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F., Nicklen S. und Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467.
- Santoro, R. und Grummt, I. (2001). Molecular mechanisms mediating methylation-dependent silencing of ribosomal gene transcription. Mol. Cell. 8(3): 719-725.
- Santoro, R., Li, J. und Grummt, I. (2002). The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. Nat. Genet. 32(3): 393-396.
- Schmid, A., Chiba, A. und Doe, C. Q. (1999). Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets. Development 126: 4653-4689.
- Schulz, C., Kiger, A. A., Tazuke, S. I., Yamashita, Y. M., Pantalena-Filho, L. C., Jones, D. L., Wood, C. G. und Fuller, M. T. (2004). A misexpression screen reveals effects of *bag-of-marbles* and TGF beta class signaling on the *Drosophila* male germ-line stem cell lineage. Genetics 167(2): 707-723.
- Schulz, C., Wood, C. G., Jones, D. L., Tazuke, S. I. und Fuller, M. T. (2002). Signaling from germ cells mediated by the *rhomboid* homolog *stet* organizes encapsulation by somatic support cells. Development 129: 4523-4534.
- Seyffert W., Gassen H.G., Hess O., Jäckle H. und Fischbach K.-F. (1998). Lehrbuch der Genetik. Stuttgart. G. Fischer.

- Shivdasani, A. A. und Ingham, P. W. (2003). Regulation of stem cell maintenance and transit amplifying cell proliferation by TGF- β signaling in *Drosophila* spermatogenesis. *Curr. Biol.* 13: 2065-2072.
- Silver, D. L. und Montell, D. J. (2001). Paracrine Signaling through the JAK/STAT Pathway Activates Invasive Behavior of Ovarian Epithelial Cells in *Drosophila*. *Cell* 107: 831-841.
- Song, X., Zhu, C. H., Doan, C. und Xie, T. (2002). Germline Stem Cells Anchored by Adherens Junctions in the *Drosophila* Ovary Niches. *Science* 296: 1855-1857.
- Sonnenblick, B. P. (1941). Germ cell movements and sex differentiation of the gonads in the *Drosophila* embryo. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 26: 273-281.
- Sonnenblick, B. P. (1950). The early embryology of *Drosophila melanogaster*. In: Demerec, M. (Ed.). *Biology of Drosophila*. Wiley. New York, NY: 62-167.
- Spradling, A. C. (1993). Developmental Genetics of Oogenesis. In: *The Development of Drosophila melanogaster*. (M. Bates und A. M. Arias, Editoren). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY: 1-70.
- Spradling, A., Drummond-Barbosa, D. und Kai T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature*. 6859: 98-104.
- Tazuke, S. I., Schulz, C., Gilboa, L., Fogarty, M., Mahowald, A. P., Guichet, A., Ephrussi, A., Wood, C. G., Lehmann, R. und Fuller, M. T. (2002). A germline-specific gap junction protein required for survival of differentiating early germ cells. *Development* 129: 2529-2539.
- Technau, G. M. und Campos-Ortega, J. A. (1986). Lineage analysis of transplanted individual cells in embryos of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 195: 489-498.
- Tio, M., Udolph, G., Yang, X. und Chia, W. (2001). *cdc2* links the *Drosophila* cell cycle and asymmetric division machineries. *Nature* 409: 1063-1067.
- Tokayasu, K. T. (1974 a). Dynamics of Spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. III. Relation between axoneme and mitochondrial derivatives. *Exp. Cell Res.* 84: 239-250.
- Tokayasu, K. T. (1974 b). Dynamics of Spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. IV. Nuclear transformation. *J. Ultrastruct. Res.* 48: 284-303.
- Tokayasu, K. T. (1975). Dynamics of Spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. VI. Significance of 'onion' nebenkern formation. *J. Ultrastruct. Res.* 53: 93-112.
- Tokayasu, K. T., Peacock, W. J. und Hardy, R. W. (1972 a). Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. I. Individualization process. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 124: 479-506.

- Tokayasu, K. T., Peacock, W. J. und Hardy, R. W. (1972 b). Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. II. Coiling process. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 127: 492-525.
- Tran, T., Brenner, T. J. und DiNardo, S. (2000). Somatic control over the germline stem cell lineage during *Drosophila* spermatogenesis. Nature 407: 754-757.
- Truman J. W. und Bate, M., (1988). Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. Dev. Biol. 125: 145-157.
- Tsai, R. Y. und McKay, R. D. (2002). A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. Genes Dev. 16(23): 2991-3003.
- Tulina, N. und Matunis, E. (2001). Control of Stem Cell Self-Renewal in *Drosophila* Spermatogenesis by JAK-STAT Signaling. Science 294: 2546-2549.
- Urban, S., Lee, J. R. und Freeman, M. (2001). *Drosophila rhomboid-1* defines a family of intramembrane serine proteases. Cell 107: 173-182.
- Van Doren, M., Williamson, A. L. und Lehmann, R. (1998). Regulation of zygotic gene expression in *Drosophila* primordial germ cells. Curr. Biol. 8: 243-246.
- Vega, F. M., Sevilla, A. und Lazo, P. A. (2004). p53 Stabilization and Accumulation Induced by Human Vaccinia-Related Kinase 1. Mol. Cell. Biol. 24: 10366-10380.
- Wagers, A. J. und Weissman, I. L. (2004). Plasticity of Adult Stem Cells. Cell 116: 639-648.
- Wang, Z. und Lin, H. (2005). The Division of *Drosophila* Germline Stem Cells and Their Precursors Requires a Specific Cyclin. Current Biol. 15: 328-333.
- Wang, Z. und Lin, H. (2004). Nanos maintains germline stem cell self-renewal by preventing differentiation. Science 303: 2016-2019.
- Ward, I. M. und Chen, J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. J. Biol. Chem. 276: 47759-47762.
- Watt, F. M. und Hogan, B. L. (2000). Out of Eden: stem cells and their niches. Science. 5457: 1427-1430.
- Weaver, B. A. A. und Cleveland, D. W. (2005). Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. Cancer Cell 8: 7-12.
- Wheeler, W. M. (1891). Neuroblasts in the arthropod embryo. J. Morphol. 4: 337-343.

- White, K. und Kankel, D. R. (1978). Patterns of cell division and cell movement in the formation of the imaginal nervous system in *Drosophila melanogaster*. Dev. Biol. 65: 296-321.
- Williamson, A. und Lehmann, R. (1996). Germ cell development in *Drosophila*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12: 365-391.
- Xie, T. und Spradling, A. C. (1998). *decapentaplegic* is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. Cell 94: 2510260.
- Yamashita, Y. M., Fuller, M. T. und Jones, D. L. (2005). Signaling in stem cell niches: lessons from the *Drosophila* germline. J. Cell Sci. 118: 665-672.
- Yamashita, Y. M., Jones, D. L. und Fuller, M. T. (2003). Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. Science 301: 1547-1550.
- Yu, S.-Y., Yoo, S. J., Yang, L., Zapata, C., Srinivasan, A., Hay, B. A. und Baker, N. E. (2002). A pathway of signals regulating effector and initiator caspases in the developing *Drosophila* eye. Development 129: 3269-3278.
- Zalokar, M. (1976). Autoradiographic study of protein and RNA formation during early development of *Drosophila* eggs. Dev. Biol. 49: 425-437.
- Zelko, I., Kobayashi, R., Honkakoski, P. und Negishi, M. (1998). Molecular Cloning and Characterization of a Novel Nuclear Protein Kinase in Mice. Archives of Biochemistry and Biophysics 352. 31-36.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W. G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J. Q. et al. (2003). Identification of the hematopoietic stem cell niche and control of the niche size. Nature 425: 836-841.
- Zhu, C. H. und Xie, T. (2003). Clonal expansion of ovarian germ-line stem cells during niche formation in *Drosophila*. Development 130: 2579-2588.

